

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Thaysa Leite Tagliaferri

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIANO DE RESÍDUOS POTENCIALMENTE
INFECTANTES, SÍTIOS ANATÔMICOS E VESTIMENTAS DE PROFISSIONAIS E
SEUS CONHECIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA EM UM SERVIÇO DE
ATENÇÃO ODONTOLÓGICA**

Belo Horizonte

2016

Thaysa Leite Tagliaferri

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIANO DE RESÍDUOS POTENCIALMENTE
INFECTANTES, SÍTIOS ANATÔMICOS E VESTIMENTAS DE PROFISSIONAIS E
SEUS CONHECIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA EM UM SERVIÇO DE
ATENÇÃO ODONTOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadora: Prof^a. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Co-orientadora: Dra. Cristina Dutra Vieira

Área de concentração: Ciências Biológicas

Belo Horizonte

2016

*À minha mãe, meu pai e meu irmão, os grandes
amores da minha vida!*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Gislene, meu pai Walter e meu irmão Giovanni pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos que precisei. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, confiarem no meu sonho e não medirem esforços para me ajudar a conquistá-lo! Amo muito vocês!

Às minhas madrinhas Teka e Vovó Marlene por todo amor, carinho e preocupação! Vocês são meus exemplos!

À minha avó Mutti, tios e primos pelos eternos incentivos e por toda a torcida!

À Profª Simone por ter aberto as portas do laboratório e confiado em mim. Obrigada pela orientação, ensinamentos e paciência. Serei eternamente grata pela oportunidade que você me concedeu!

À Cristina Dutra por toda a compreensão e o companheirismo. Mais do que uma co-orientação, tenho certeza que ganhei uma amizade!

À Profª. Paula, Prof. Luiz e Profª Dodora por todo o apoio e disponibilidade.

Nada disso teria acontecido se não fosse a intervenção, o apoio e a torcida da Hellem Carneiro. Amiga, nunca vou conseguir parar de te agradecer por tudo!

Agradeço a cada amigo do MOA que me acolheu e deixou esse período mais leve. Obrigada pelas ajudas com os experimentos e pelos maravilhosos dias dentro do laboratório! Cada um de vocês é muito especial pra mim!

Um agradecimento especial à Amanda Borges, pela disposição e pela ajuda, sempre que precisei! À Bonitinha (Natália Guimarães) por ter me oferecido apoio no primeiro dia de mestrado e por ter se tornado uma grande amiga durante todo esse período! À Silvinha Pietra por todo o carinho e amizade dentro e fora do Laboratório! À Anninha Guimarães pela cumplicidade e pela constante alegria que contagia todos ao seu redor! Ao Samir Elian pela amizade e pela companhia em todas as horas!

Agradeço aos amigos do LEFM Rafael Bastos, Leonardo Acurcio, Sávio Sandes e Felipão da Massa (Felipe Sant'Anna) pelas conversas e ajudas nos experimentos.

Ao Ary (Arthur Dantas) pelas eternas caronas e conversas diárias. Ao Mateus Scarpelli e ao Inhotim (Rafael Pinheiro) pela ajuda nas análises desse trabalho.

A todos os colegas da Pós-Graduação pela troca de conhecimento e pelos momentos de alegria, especialmente à Baby (Bárbara Porto) por todo o carinho!

Aos amigos da Equipe iGEM UFMG_Brazil por serem um grupo tão maravilhoso e por terem me ensinado tanta coisa. Conhecer a biologia sintética foi um presente e participar da competição foi indescritivelmente enriquecedor. Obrigada Prof^a Liza Felicori e Prof^a Rafaela Ferreira pela oportunidade!

À minha amiga Dani Filhusi pelo companheirismo de mais de uma década e conselhos para todas as horas. Amo você! É um privilégio poder contar com sua amizade em todos os momentos da minha vida!

Às amigas Rafaela Gonçalves, Larissa Tavares, Amanda Ariane, Suellen Multari e Grazielle Cristina por toda a amizade! Sempre levarei o carinho de vocês junto comigo!

À Rede CsF por ser um ambiente de crescimento pessoal, transformação e troca de experiências! É extremamente gratificante trabalhar com vocês e poder dar um retorno para o país depois de tanto investimento! Um agradecimento especial à Monique Gasparoto pela confiança, carinho e doçura! Ao João Paulo Almeida pela amizade e parceria em todas as horas! Ao Guilherme Rosso por toda a ajuda e pelas conversas! A toda a equipe do Melhoria CsF pelo trabalho e troca de conhecimentos!

A todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia.

A todos os profissionais do Centro Odontológico, especialmente os voluntários dessa pesquisa, que colaboraram para a realização desse estudo!

Aos órgãos de fomento por viabilizarem essa pesquisa.

Aos acasos da vida, já que, sem eles, não estaria hoje onde estou.

À Deus, por iluminar meus caminhos.

A todos os amigos, que, de alguma forma, torceram por mim!

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar”*

Esopo

RESUMO

Os resíduos infectantes são potenciais fontes de micro-organismos patogênicos, podendo representar risco para o profissional que os manuseia, bem como para o meio ambiente. Os trabalhadores que manipulam resíduos estão mais sujeitos a infecções causadas por esses micro-organismos quando comparados a outros profissionais da saúde. Para a detecção de uma possível contaminação de funcionários a partir do ambiente de trabalho e seu risco, esse estudo objetivou avaliar o perfil microbiano de resíduos potencialmente infectantes, sítios anatômicos e vestimentas de profissionais e seus conhecimentos de biossegurança em um serviço de atenção odontológica. Os resíduos potencialmente infectantes obtidos em 24 horas foram coletados e o seu quarteamento foi realizado para a obtenção do líquido lixiviado. O conteúdo microbiano das fossas nasais, mão e aventais foi obtido com o auxílio de *swabs* esterilizados. Após cultivo em meios ricos e seletivos, os micro-organismos passaram por triagem morfológica, bioquímica e aqueles considerados clinicamente relevantes foram identificados e avaliados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos por meio do sistema automatizado Vitek® 2. A capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foi avaliada pelo ensaio de microplacas de poliestireno a 25°C e 37°C, nos tempos de 4h, 24h e 48h de incubação. Além disso, fatores que favoreçam sua aderência como hipervirulência e formação de Substância Polimérica Extracelular (do inglês EPS), avaliadas por meio do teste do fio e Agar vermelho congo, respectivamente, foram verificados. A pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e a análise de similaridade clonal entre as amostras de *P. aeruginosa* coletadas nos funcionários e nos resíduos, foi estabelecida pelo *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Um questionário foi aplicado para avaliar o conhecimento dos funcionários sobre biossegurança e os resultados obtidos nos alertam sobre a necessidade de programas de treinamento regulares com todos os profissionais da instituição abordando o descarte correto de perfurocortantes, a importância da vacinação, medidas de higienização das mãos, bem como reforço teórico sobre os riscos dos resíduos e conteúdos essenciais para um bom gerenciamento de resíduos. Dos 373 micro-organismos isolados, 28 bactérias clinicamente relevantes e 12 leveduras foram selecionadas para estudos futuros. *P. aeruginosa* foi a bactéria Gram-negativa predominante, presente tanto nos resíduos quanto nas mãos de um funcionário. *S. aureus* foi a única espécie Gram-positiva de relevância clínica isolada, presente apenas nos funcionários e *C. haemulonii* foi a levedura com maior prevalência nesse estudo, também recuperada apenas nos profissionais. Aproximadamente 60% das amostras

Gram-negativas foram resistentes à ceftriaxona e a cefuroxima e mais da metade delas apresentaram resistência à ampicilina e ceftioxina. Todas as amostras de *S. aureus* foram resistentes à benzilpenicilina. A presença do gene *bla*_{TEM} foi detectada em cinco amostras, sendo elas uma *E. coli*, uma *K. pneumoniae* e três *P. aeruginosa*. A amostra de *K. pneumoniae* foi a única a apresentar resultado positivo para o gene *bla*_{SHV}. Todas as amostras de *S. aureus* isoladas nesse estudo foram positivas para o gene *bla*_Z. Após a detecção da similaridade clonal entre *P. aeruginosa*, três *clusters* diferentes foram criados e a amostra recuperada nas mãos do funcionário obteve baixa similaridade genética com as demais amostras isoladas nos resíduos. Entretanto, a presença de patógenos em trabalhadores nos alerta sobre o descuido com procedimentos de biossegurança. A amostra de *P. aeruginosa* isolada nas mãos do funcionário foi a única a não apresentar produção de EPS e foi não-aderente ou fracamente aderente nas temperaturas e tempos testados. No geral, as amostras de *P. aeruginosa* avaliadas foram mais aderentes a 25°C após 48 horas de incubação. A amostra de *K. pneumoniae* isolada não apresentou o fenótipo de hipervirulência, mas foi fortemente aderente a 25°C, após 24 horas de incubação. A capacidade das amostras de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* de formar biofilmes fortemente aderentes à temperatura ambiente destaca a importância do processamento contínuo de superfícies e materiais de assistência à saúde, por meio de limpeza e desinfecção e o provável risco para os profissionais envolvidos nestas atividades.

Palavras-chave: Resíduos Potencialmente Infectantes. Risco Ocupacional. Resistência Bacteriana. Biofilme.

ABSTRACT

Infectious wastes are potential sources of pathogenic microorganisms, which may represent a risk for those professional who handle them as well as for the environment. Waste handlers are more susceptible to infections caused by these microorganisms when compared to other healthcare professionals. To detect a probable employee contamination from the workplace and its risk, this study aimed to evaluate the microbial content of potentially infectious waste, anatomical sites and professional gowns and their biosafety knowledge in a dental healthcare service. A 24hour generation of potentially infectious waste was collected and its quartering was conducted for obtaining the leached liquid. The microbial content of the nasal mucosa, hand and gowns was evaluated by sterile swabs. After growing in rich and selective media, the microorganisms were undergone by a morphological and biochemical screening and those considered clinically relevant were identified and had their resistance profile tested through VITEK® 2 Compact. The biofilm formation of *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* was evaluated by the polystyrene microplate assay at 25°C and 37°C after 4h, 24h and 48h. Other factors which favor its adherence, including hypervirulence and Extracellular polymeric substances (EPS) formation, evaluated through string test and Congo Red Agar, respectively, were also assessed. To check resistance genes and the similarity between waste and one worker *P. aeruginosa* samples, the reaction of polymerase chain (PCR) and the *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), respectively, were used. A questionnaire was administered to assess the biosecurity knowledge of employees and its results warn us about the need of regular training programs for all the institutional staffs, in which there would be discussions about the correct disposal of sharps objects, importance of vaccination, hand hygiene measures and also highlighting the waste risk and the essential elements for a correct waste management. Of the 373 microorganisms isolated in this study, 28 bacteria were isolated and 12 clinically relevant yeasts were selected for further studies. *P. aeruginosa* was the predominantly Gram-negative isolated, present in both waste and worker hands. *S. aureus* was the only clinically relevant Gram-positive isolated, recovered only in employees and *C. haemulonii* was the prevalent yeast specie. Approximately 60% of Gram-negative strains were resistant to ceftriaxone and cefuroxime and over half of them were resistant to ampicillin and cefoxitin. All *S. aureus* were resistant to benzylpenicillin. The presence of the *bla*_{TEM} gene was detected in five samples of our study, including one *E. coli*, one *K. pneumoniae*, and three *P. aeruginosa*. *K. pneumoniae* was the only isolate to present a positive result for the *bla*_{SHV} gene. All *S. aureus* strains isolated in this study were positive for *bla*_Z gene. After the

detection of clonal similarity between *P. aeruginosa* isolates, three different clusters were created and the sample recovered in the worker hands had low genetic similarity when compared to the waste ones. However, the presence of pathogens in worker hands indicates the lack of biosafety procedures. *P. aeruginosa* isolated in waste handler hands was the only one not to present EPS production and its biofilm was non-adherent or weakly adherent in the tested temperatures and times. In general, *P. aeruginosa* samples were more adherent at 25°C after 48 hours of incubation. The *K. pneumoniae* isolate did not show the hypervirulent phenotype and was strongly adherent at 25°C, after 24 hours of incubation. The ability of *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* to form strongly adherent biofilms at room temperature highlights the importance of continuous cleaning and disinfection process on surfaces and healthcare materials.

Keywords: Potentially infectious waste. Occupational risk. Bacterial resistance. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cadeia de infecção	26
Figura 2 – PBPs responsáveis pela formação da parede celular	41
Figura 3 – Mecanismo de ação das β -lactamases	42
Figura 4 – Formação e desenvolvimento de biofilmes	47
Figura 5 – Quarteamento dos resíduos infecciosos odontológicos gerados durante 24 horas	52
Figura 6 – Material perfurocortante descartado incorretamente junto aos resíduos potencialmente infectantes	66
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose de PCR para pesquisa dos genes <i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>	76
Figura 8 – Dendograma de amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de resíduos potencialmente infectantes e de trabalhadores que os manuseiam	77
Figura 9 – Produção de EPS por amostras de <i>P. aeruginosa</i>	78
Figura 10 – Teste do fio para avaliação de hipervirulência em <i>K. pneumoniae</i>	79
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose para o gene <i>blaZ</i> em <i>S. aureus</i>	114
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose de PCR para RAPD	115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das β -lactamases segundo Bush-Jacoby e Amber	43
Quadro 2 – Oligonucleotídeos, amplicons e condições de reação de PCR utilizados na pesquisa de genes de resistência à antimicrobianos.....	59
Quadro 3 – Amostras bacterianas isoladas de funcionários e de resíduos infectantes em fevereiro e março de 2014	68
Quadro 4 – Leveduras isoladas de funcionários e de resíduos potencialmente infectantes.....	69
Quadro 5 – Perfil genético das amostras de <i>P. aeruginosa</i> analisadas por RAPD e o tamanho das bandas amplificadas.....	115
Quadro 6 – Fenótipo de aderência do biofilme das amostras de <i>P. aeruginosa</i> durante 4, 24 e 48 horas de incubação.....	116

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Dados pessoais e profissionais dos funcionários da Instituição	64
Tabela 2 – Micro-organismos, doenças e materiais biológicos que podem ser encontrados nos resíduos e podem estar envolvidos em processos infecciosos	65
Tabela 3 – Morfotipos isolados nos funcionários e nos resíduos potencialmente infectantes	67
Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e suas concentrações inibitórias mínimas nos isolados Gram-negativos	72
Tabela 5 – Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e suas concentrações inibitórias mínimas nos isolados Gram-positivos	74
Gráfico 1 – Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras Gram-negativas isoladas de funcionários e dos resíduos	71
Gráfico 2 – Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de funcionários	71
Gráfico 3 – Aderência do biofilme formado por amostras de <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i> em diferentes condições de incubação	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI - *Brain Heart Infusion*

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECDC - *European Center for Disease Prevention and Control*

EPIs - Equipamentos de Proteção Individual

EPS - Substância Polimérica Extracelular

ESBLs - β -lactamases de espectro estendido

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA - *United States Food and Drug Administration*

GlcNAc - N-acetilglicosamina

HIV - Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana

LPS - Lipopolissacarídeo

MBLs - Metallo- β -lactamases

MDR - Multidroga-resistente

MRSA - *S. aureus* resistente à meticilina

MurNAc - N-acetilmurâmico

OMS - Organização Mundial de Saúde (do inglês WHO)

PBPs - Proteína de ligação à penicilina

PBP2a - Proteína de ligação à penicilina alternativa

PBS - Tampão fosfato-salino

PDR - Panresistente a drogas

PEG - Polietilenoglicol

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

RSS - Resíduos de Serviços de Saúde

TBE - Tris-Borato-EDTA

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TSA - *Tryptic Soy Agar*

TSB - *Tryptic Soy Broth*

TSST - Toxina da Síndrome do Choque Tóxico

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method algorithm*

XDR - Extensamente resistentes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Resíduos de Serviço de Saúde	20
2.1.1 <i>Gerenciamento dos RSS</i>	23
2.1.2 <i>Resíduos potencialmente infectantes da Odontologia e prováveis riscos associados</i>	24
2.2 Micro-organismos clinicamente relevantes	28
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
2.2.3 <i>Acinetobacter spp.</i>	32
2.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
2.2.5 <i>Escherichia coli</i>	35
2.2.6 <i>Candida spp.</i>	37
2.3 Resistência aos antimicrobianos	38
2.3.1 <i>Gene mecA</i>	40
2.3.2 <i>Genes codificadores de β-lactamases</i>	41
2.4 Formação de biofilmes.....	46
3 OBJETIVOS	49
3. 1 Objetivo geral	49
3. 2 Objetivos específicos	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Questionário aplicado aos funcionários	51
4.2 Coleta das amostras	51
4.2.1 <i>Amostragem do estudo</i>	51
4.2.2 <i>Instituições participantes</i>	53
4.2.3 <i>Período do estudo</i>	53
4.2.4 <i>Aspectos éticos</i>	54
4.3 Etapa laboratorial.....	54
4.3.1 <i>Isolamento e armazenamento</i>	54
4.3.2 <i>Identificação das amostras isoladas</i>	55
4.3.3 <i>Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos</i>	56
4.3.4 <i>Deteção genotípica de β-lactamases</i>	56

4.3.5 Sequenciamento do gene de interesse.....	60
4.3.6 Caracterização do perfil de similaridade clonal das amostras	61
4.3.7 Ensaios de formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i>	62
5 RESULTADOS	64
5.1 Questionário.....	64
5.1.1 Dados pessoais e profissionais	64
5.1.2 Informações sobre os resíduos	64
5.1.3 Equipamentos de Proteção Individual e Vacinação	65
5.2 Isolamento e identificação microbiológica	66
5.2.1 Identificação de amostras bacterianas	67
5.2.2 Identificação de leveduras.....	69
5.3 Perfil de susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos	70
5.4 Detecção genotípica de resistência a antimicrobianos.....	76
5.4.1 Detecção dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}	76
5.4.2 Detecção dos genes <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{GIM} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{SPM}	76
5.4.3 Detecção dos genes <i>bla</i> _Z e <i>mecA</i>	76
5.5 Sequenciamento	77
5.6 Caracterização de similaridade genética das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas.....	77
5.7 Detecção fenotípica da formação de biofilme em amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	78
5.7.1 Produção de Substância Polimérica Extracelular	78
5.7.2 Avaliação da hipervirulência (hipermucosividade) da amostra de <i>K. pneumoniae</i>	78
5.7.3 Aderência de biofilme por <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i> em microplacas de poliestireno.....	79
6 DISCUSSÃO	82
7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
APÊNDICE A	112
APÊNDICE B.....	114
APÊNDICE C	115
APÊNDICE D	116
ANEXO A.....	117

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Por definição do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2005), os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) são todos aqueles resultantes de serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal que, por suas características, necessitam de processos diferenciados em seu manejo.

Dentre os RSS encontram-se os resíduos infectantes, que são potenciais fontes de micro-organismos patogênicos, podendo representar risco para o profissional que os manuseia, bem como para o ambiente institucional e meio ambiente, caso não sejam corretamente gerenciados. Devido à atividade ocupacional, os trabalhadores que manipulam resíduos estão mais sujeitos a infecções causadas por meio de cortes ou perfurações, inalação ou contato de micro-organismos com a pele não íntegra ou as mucosas. Entretanto, outros profissionais de centros de atenção à saúde podem ser indiretamente afetados com o mau gerenciamento dos resíduos de serviço de saúde, como ocorre normalmente em países em desenvolvimento (HOSSAIN *et al.*, 2013).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2006), os resíduos gerados pelos Serviços de Saúde, especialmente aqueles advindos da Odontologia, requerem a ampliação e o aprofundamento de estudos. Dentro dessa temática são abordadas questões sobre a saúde ocupacional, a saúde dos usuários do serviço assim como o saneamento ambiental.

Em 2008, Rice definiu a classificação ESKAPE, que inclui os patógenos frequentemente envolvidos em infecções nosocomiais e que são responsáveis por uma alta taxa de resistência aos antimicrobianos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Vieira e colaboradores, em 2011, isolaram todos os gêneros dos micro-organismos acima citados em resíduos potencialmente infectantes provenientes de diferentes instituições de atenção à saúde da Odontologia. Os autores concluíram que esses resíduos são um risco em potencial para trabalhadores destas instituições e também para o ambiente, devido à possibilidade de disseminação de genes de resistência.

Anualmente, cerca de 320.000 trabalhadores morrem devido a doenças infecciosas relacionadas ao trabalho. Acredita-se que esse número seja ainda maior quando se avalia a

morbidade, porém muitos casos não são registrados devido à dificuldade de correlacionar com precisão a doença adquirida com a exposição a riscos durante a jornada de trabalho (HAAGSMA *et al.*, 2012).

Para a avaliação de uma possível contaminação de funcionários a partir do ambiente de trabalho é importante que se identifique os micro-organismos presentes nos sítios anatômicos destes profissionais correlacionando-os com aqueles do ambiente. As mãos e as vestimentas dos profissionais são consideradas locais que entram em contato frequente com objetos, equipamentos e superfícies e, portanto, podem estar relacionados com uma primeira etapa do processo de contaminação do indivíduo pelo ambiente incluindo a aquisição de bactérias resistentes a antimicrobianos (HESS *et al.*, 2013). A manipulação dos resíduos gera também bioaerossóis que podem conter bactérias vivas ou mortas, fungos, vírus e toxinas, contribuindo para a ocorrência de doenças pulmonares e infecções de origem ocupacional (HARRISON, 2007).

Para que a doença infecciosa se instale, é necessária a presença do patógeno, sua dose e virulência, a susceptibilidade do hospedeiro e a porta de entrada (WHO, 2014). Para analisar essa correlação entre os micro-organismos nos funcionários e nos RSS, é importante que se avalie, primeiramente, a sua presença nestes resíduos e, posteriormente, se constate sua presença nas mãos, fossas nasais e aventais dos profissionais, analisando os fatores de virulência e resistência presentes. Para que o papel do profissional na cadeia de infecção seja ressaltado ou minimizado, é importante, também, conhecer sua percepção sobre o risco ocupacional relacionado ao gerenciamento dos RSS e as medidas individuais adotadas na sua prática diária com o objetivo de controlar e prevenir doenças infecciosas.

Com esta perspectiva, o presente estudo pretende avaliar aspectos microbiológicos dos resíduos e daqueles recuperados em sítios anatômicos e superfícies dos profissionais, buscando estabelecer a correlação acima mencionada. Além da busca por este conhecimento, ainda escasso na literatura, esse estudo se torna relevante devido ao fato de que as políticas públicas relacionadas ao gerenciamento dos RSS nos países em desenvolvimento ainda são incipientes e com pouco embasamento científico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resíduos de Serviço de Saúde

Dentre os diversos tipos de resíduos sólidos coletados no País, aproximadamente 690 toneladas correspondem a RSS, o que significa menos de 1% da quantidade total de resíduos sólidos urbanos coletados diariamente. Embora produzidos em pequenas quantidades quando comparados a outros resíduos sólidos, os RSS merecem atenção especial, pois sua manipulação incorreta e mau gerenciamento podem causar sérias consequências aos trabalhadores que os manuseiam, à saúde pública, além de causar impactos significativos no meio ambiente (ABRELPE, 2013; WHO, 2014).

Para um melhor entendimento da complexidade desses resíduos, a resolução do CONAMA de 2005, ainda vigente, estabeleceu que a definição de RSS se aplica a:

[...] todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal, inclusive os serviços de assistência domiciliar e de trabalhos de campo; laboratórios analíticos de produtos para saúde; necrotérios, funerárias e serviços onde se realizem atividades de embalsamamento (tanatopraxia e somatoconservação); serviços de medicina legal; drogarias e farmácias inclusive as de manipulação; estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de saúde; centros de controle de zoonoses; distribuidores de produtos farmacêuticos; importadores, distribuidores e produtores de materiais e controles para diagnóstico in vitro; unidades móveis de atendimento à saúde; serviços de acupuntura; serviços de tatuagem, entre outros similares.

Ainda segundo o CONAMA (2005), em consonância com a ANVISA (2004a) esses resíduos são ainda subdivididos em cinco grupos, de acordo com suas características. São eles:

- Grupo A - Resíduos potencialmente infectantes ou biológicos;

São aqueles resíduos contendo a possível presença de agentes biológicos que podem conferir risco de infecção devido à sua maior virulência ou concentração. Esse grupo é ainda subdividido em cinco subgrupos de acordo com sua periculosidade e necessidade de tratamento prévio: A1, A2, A3, A4 e A5.

O subgrupo A1 é composto por:

Culturas e estoques de microrganismos; resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; descarte de vacinas de microrganismos vivos ou atenuados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética; resíduos resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou

certeza de contaminação biológica por agentes classe de risco 4, microrganismos com relevância epidemiológica e risco de disseminação ou causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido; bolsas transfusionais contendo sangue ou hemocomponentes rejeitadas por contaminação ou por má conservação, ou com prazo de validade vencido, e aquelas oriundas de coleta incompleta; sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos, recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, contendo sangue ou líquidos corpóreos na forma livre.

No subgrupo A2, encontram-se:

Carcças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações, e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anátomo-patológico ou confirmação diagnóstica.

Estão presentes no subgrupo A3:

Peças anatômicas (membros) do ser humano; produto de fecundação sem sinais vitais, com peso menor que 500 gramas ou estatura menor que 25 cm ou idade gestacional menor que 20 semanas, que não tenham valor científico ou legal e não tenha havido requisição pelo paciente ou familiares.

Compõe o subgrupo A4:

Kits de linhas arteriais, endovenosas e dialisadores, quando descartados; filtros de ar e gases aspirados de área contaminada; membrana filtrante de equipamento médico-hospitalar e de pesquisa, entre outros similares; sobras de amostras de laboratório e seus recipientes contendo fezes, urina e secreções, provenientes de pacientes que não contenham e nem sejam suspeitos de conter agentes Classe de Risco 4, e nem apresentem relevância epidemiológica e risco de disseminação, ou microrganismo causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido ou com suspeita de contaminação com príons; resíduos de tecido adiposo proveniente de lipoaspiração, lipoescultura ou outro procedimento de cirurgia plástica que gere este tipo de resíduo; recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, que não contenha sangue ou líquidos corpóreos na forma livre; peças anatômicas (órgãos e tecidos) e outros resíduos provenientes de procedimentos cirúrgicos ou de estudos anátomo-patológicos ou de confirmação diagnóstica; carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de micro-organismos, bem como suas forrações; e bolsas transfusionais vazias ou com volume residual pós-transfusão.

No subgrupo A5, estão incluídos: “órgãos, tecidos, fluidos orgânicos, materiais perfurocortantes ou escarificantes e demais materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação com príons”.

- **Grupo B** - Resíduos químicos;

São aqueles resíduos compostos por substâncias químicas que podem causar danos à saúde pública ou ao ambiente, dependendo de sua inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade.

- **Grupo C** - Resíduos radioativos;

Esse grupo é composto por aqueles rejeitos que contenham radionuclídeos em quantidade superior aos limites de eliminação.

- **Grupo D** - Resíduos comuns ou semelhantes a domiciliares;

São aqueles materiais que não apresentam risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao ambiente, podendo ser equiparados àqueles domiciliares.

- **Grupo E** - Resíduos perfurocortantes;

São aqueles resíduos com propriedades perfurocortantes ou escarificantes.

Caso esses resíduos sejam corretamente classificados, aproximadamente 80% deles se enquadram no Grupo D, 15% no Grupo A, 1% nos perfurocortantes, 3% correspondem a resíduos químicos e 1% representa o restante. Devido à carga microbiana presente nos resíduos do grupo A, que oferece risco para o ambiente, para a saúde ocupacional dos funcionários que os manuseiam, além de possuir uma alta porcentagem de geração em ambientes de atenção à saúde, esse grupo foi escolhido como foco deste estudo (CONAMA, 2005; IPEA, 2012; HOSSAIN, 2013).

A classificação para os RSS é necessária, já que permite e facilita a identificação dos materiais gerados pelas instituições, contribuindo para um melhor gerenciamento dos mesmos. A responsabilidade de implementar e gerenciar adequadamente os RSS até a sua disposição final é do estabelecimento gerador. Esse processo compreende um conjunto de atividades aplicáveis à minimização da geração, ao manuseio, à segregação dos resíduos na origem, à coleta, condicionamento, transporte, armazenamento, controle, registro, tratamento, e, por último, à disposição final desses materiais. Além disso, deve-se ressaltar que as condições de trabalho e as medidas preventivas de saúde e segurança são importantes para um programa de gerenciamento eficaz, já que muitas dessas etapas envolvem possibilidades de contato direto com os resíduos, aumentando as chances de uma possível contaminação dos

profissionais que os manuseiam (ANVISA, 2004a; FEAM, 2008; IPEA, 2012; HOSSAIN, 2013).

2.1.1 Gerenciamento dos RSS

O gerenciamento de RSS é o conjunto de procedimentos de gestão que tem como objetivo minimizar a produção dos resíduos e promover um encaminhamento adequado e seguro desses materiais, visando a proteção dos trabalhadores, a preservação da saúde pública, dos recursos naturais e também do meio ambiente. O gerenciamento dos RSS deve incluir o planejamento de recursos físicos, materiais e a capacitação de recursos humanos envolvidos no manejo (ANVISA, 2004a).

A primeira etapa do gerenciamento se inicia com a conscientização dos profissionais para a minimização da geração de resíduos, o que reduz também os riscos de exposição à agentes infecciosos e os custos com seu tratamento. Esses materiais devem ser segregados no local e no momento de sua geração, respeitando suas características físicas, químicas, biológicas e radiológicas. Os funcionários que manuseiam os resíduos gerados nas instituições de saúde devem, obrigatoriamente, utilizar Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), os quais necessitam ser adequados com o biotipo de cada indivíduo, sendo seu fornecimento de responsabilidade do empregador. Além disso, é necessário que os profissionais sejam vacinados e exames laboratoriais para avaliação da resposta imunológica devem ser realizados (ANVISA, 2004a; CONAMA, 2005; FEAM, 2008).

O acondicionamento dos RSS deve ser feito em embalagens devidamente identificadas e adequadas para sua coleta, transporte, armazenamento e disposição final. Os resíduos sólidos potencialmente infectantes devem ser dispostos em sacos de cor branca ou vermelha, de acordo com suas características e acondicionados em recipientes confeccionados com materiais laváveis, resistentes a rupturas, puncturas e vazamentos, contendo tampa provida de abertura sem contato manual. Para o transporte dos RSS, cada recipiente deve ser de uso exclusivo e específico para cada grupo de resíduos (ANVISA, 2004a; CONAMA, 2005; FEAM, 2008).

Após o recolhimento, os resíduos são transportados do ponto de geração, devem ficar armazenados temporariamente em um ambiente específico e seu registro deve ser realizado para controle e monitoramento de sua quantidade e avaliação de outros indicadores de interesse. Após esse período, os resíduos deverão ser encaminhados para a sua destinação

final ou tratados para que haja a redução ou eliminação dos riscos de contaminação ambiental, à saúde pública e acidentes ocupacionais. Dependendo de suas características, esses materiais necessitam ser submetidos a tratamento interno preliminar (subgrupos A1 e A2) para depois receberem tratamento externo, cujo método deve ser avaliado de acordo com as vantagens e desvantagens de cada processo, como incineração, autoclavagem, micro-ondas, entre outros. (ANVISA, 2004a; CONAMA, 2005; FEAM, 2008).

Um programa de gerenciamento de resíduos ineficiente, seja pela apresentação de falhas no conhecimento dos RSS gerados na instituição, na sua identificação, segregação, nas medidas de biossegurança ou em qualquer outra etapa do processo, pode oferecer riscos de transmissão de doenças infecciosas e contaminação ao ambiente. Para a detecção dessas falhas, que muitas vezes são geradas devido à escassez de estudos na área, a Organização Mundial de Saúde (OMS, do inglês WHO) sugere que se façam pesquisas por meio de questionários, objetivando a captação de dados consistentes da instituição e identificação de falhas no gerenciamento. Dessa forma, medidas preventivas mais precisas poderão ser implementadas por meio da oferta de treinamentos e capacitação desses profissionais (HOSSAIN *et al.*, 2011; IPEA, 2012; WHO, 2014).

2.1.2 Resíduos potencialmente infectantes da Odontologia e prováveis riscos associados

Atualmente, os resíduos gerados em serviços odontológicos são uns dos mais relevantes produzidos em centros de atenção à saúde. Devido ao crescimento da demanda por esses profissionais nas últimas décadas, a quantidade de geração de RSS nessas instituições aumentou significativamente, os quais são, em grande parte, compostos por luvas e máscaras, mas também podem conter algodões, gazes e outros materiais contaminados com sangue ou outros fluidos corporais (BAZRAFESHAN *et al.*, 2014; WHO, 2014).

2.1.2.1 Riscos associados aos trabalhadores que manuseiam os resíduos

Vieira *et al.* (2009) avaliaram a composição gravimétrica dos resíduos odontológicos de três instituições de Belo Horizonte, incluindo a do presente estudo, e encontraram uma porcentagem de resíduos potencialmente infectantes que variou de 15% a 29% do total coletado em 24 horas. Em outros estudos, os mesmos autores avaliaram o conteúdo microbiano desse subgrupo de resíduos coletados nas três instituições odontológicas e isolaram diversos gêneros e espécies de micro-organismos com potencial patogênico,

incluindo *Staphylococcus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia* spp., *Acinetobacter* spp. e *Candida* spp.. (VIEIRA *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2011).

Além de bactérias e fungos presentes nos resíduos, o bioaerossol gerado pela sua manipulação pode conter vírus e toxinas que podem ser danosos caso entrem em contato com alguma porta de entrada do hospedeiro. Particularmente, os vírus mais preocupantes são o da Imunodeficiência Humana (do inglês HIV) e o da Hepatite B, transmitidos principalmente por objetos perfurocortantes contaminados com sangue, quando os mesmos são incorretamente segregados e/ou manipulados (HARRISON, 2007; WHO, 2014).

Um outro aspecto de risco dos RSS é o tempo de sobrevivência dos micro-organismos nesses materiais. De acordo com Park *et al.* (2009), bactérias do gênero *Staphylococcus* e amostras de *Pseudomonas aeruginosa* conseguem sobreviver em resíduos clínicos nas temperaturas de 30°C e 6°C, por até 30 e 40 dias, respectivamente. Ao avaliar amostras de *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium diphtheria* após 40 dias, os autores relataram que 99,9% dos micro-organismos já não estavam mais viáveis. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014), o vírus da Hepatite B pode sobreviver por até uma semana e permanecer viável à exposição a alguns antissépticos e ao álcool 70%. O HIV, por sua vez, é menos resistente, sobrevivendo apenas 15 minutos quando exposto ao álcool 70%, porém às condições ambientais, pode sobreviver por três a sete dias.

Devido às características já citadas dos RSS, esses podem se apresentar como um risco para diversos profissionais, principalmente para aqueles que os manuseiam e gerenciam (HOSSAIN, 2013; WHO, 2014). Para que haja a transmissão de infecções, são necessários a presença do patógeno em dosagem e virulência suficientes, uma porta de entrada e um hospedeiro susceptível. A Figura 1 ilustra a cadeia de infecção com todos os componentes que precisam estar presentes para a sua ocorrência. O entendimento de cada processo se torna necessário para a interrupção da cadeia de infecção e, no caso de profissionais que manuseiam os resíduos, as medidas de controle são normalmente focadas no estágio “modo de transmissão” da referida cadeia (WHO, 2014).

De acordo com Haagsma *et al.* (2012), cerca de 320 mil trabalhadores morrem anualmente em todo o mundo devido às doenças infecciosas relacionadas ao trabalho.

Acredita-se que os números relacionados às morbidades sejam ainda maiores, no entanto há dificuldade de se avaliar e comprovar com exatidão a incidência destes eventos.

Figura 1: Cadeia de infecção microbiana



Legenda: Agente infeccioso: qualquer micro-organismo capaz de causar doença; Reservatório: qualquer lugar onde o micro-organismo possa crescer e se reproduzir (seres humanos, animais, objetos); Porta de saída: o meio pelo qual o micro-organismo deixa o reservatório (pele, mucosa, trato urinário); Modo de transmissão: como o micro-organismo se move de um lugar ao outro (contato direto, perdigotos, ar); Porta de entrada: uma abertura que possibilite a invasão pelo micro-organismo no hospedeiro; Hospedeiro susceptível: indivíduos com baixa imunidade ou baixa resistência física para prevenir ou combater infecções. Adaptado de WHO, 2014.

No Brasil, pesquisadores criaram, em 2002, o sistema de vigilância de acidente de trabalho com material biológico em serviços de saúde. Esse sistema é de notificação voluntária e *on line* e objetiva conhecer como os acidentes ocupacionais ocorrem e fornecer informações para que os serviços de saúde possam implementar medidas de prevenção (RAPARRINI & REINHARDT, 2010). Desde 2002 até setembro de 2015, esse sistema notificou 12.534 acidentes, sendo 7,2% destes (894) afetando profissionais do setor de higienização e limpeza. O estudo relata também que 725 acidentes foram causados por agulhas ou outros objetos cortantes descartados inapropriadamente durante o manuseio de resíduos (RISCOBIOLÓGICO.ORG, 2015).

Além do risco de autoinfecções, os profissionais que manuseiam os resíduos podem servir como veículo de transmissão de micro-organismos patogênicos para outros

funcionários, pacientes ou superfícies. De acordo com a ANVISA (2004b) e a OMS (2009), as mãos são importantes fontes exógenas de transmissão de patógenos envolvidos em infecções e podem se contaminar após a realização de diversas atividades, incluindo o contato com RSS. Além disso, o avental desses profissionais também pode ser contaminado com micro-organismos e contribuir para o aumento da carga microbiana das mãos por meio do contato ou da retirada desse componente (HESS *et al.*, 2013). Morgan *et al.* (2010) isolaram amostras de *Acinetobacter baumannii* das mãos de profissionais da saúde, após a retirada das luvas e antes da sua higiene. Esse resultado confirma a necessidade de lavagem frequente das mãos sempre após a mudança de atividade e após a manipulação de materiais potencialmente infectantes, considerando que essa prática é a ação isolada mais importante para prevenir infecções em ambientes de assistência à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; ANVISA, 2004b). Esses autores também isolaram *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* dos aventais de profissionais da saúde, comprovando a contaminação que, junto com a das mãos, é o primeiro passo para a aquisição de bactérias potencialmente patogênicas do ambiente (MORGAN *et al.*, 2010, HESS *et al.*, 2013).

2.1.2.2 Riscos associados ao meio ambiente

Nas últimas décadas, com o crescimento populacional, a urbanização e o crescimento econômico, muito tem se falado sobre sustentabilidade ambiental, que pode ser conceituada como “uma relação na qual os efeitos das atividades humanas permanecem dentro de limites que não deterioram a saúde e a integridade de sistemas auto-organizados que fornecem o contexto ambiental para essas atividades” (IPEA, 2010).

O gerenciamento inadequado dos RSS e sua disposição incorreta ferem o princípio da sustentabilidade e são considerados fatores geradores de poluição e crimes ambientais. Conforme já citado, dentro desses resíduos há importantes frações que podem conter micro-organismos capazes de causar doenças ou oferecer risco de acidentes. Com um gerenciamento adequado, como a simples segregação na fonte geradora, esses materiais podem ser tratados da forma correta, de acordo com as suas características, evitando dessa forma que resíduos potencialmente infectantes atinjam o solo e o lençol freático e causem epidemias ou até mesmo endemias nas regiões contaminadas (NAIME, RAMALHO e NAIME, 2008).

Cabe ressaltar também que os resíduos potencialmente infectantes são importantes fontes de genes de resistência, os quais podem eventualmente estar inseridos em elementos

genéticos móveis permitindo assim a disseminação desses genótipos para micro-organismos indígenas presentes no solo e na água (VIEIRA *et al.*, 2011).

2.2 Micro-organismos clinicamente relevantes

Em 2008, Rice criou uma classificação destinada aos patógenos que estão frequentemente envolvidos em infecções nosocomiais e que são responsáveis por uma alta taxa de resistência aos antimicrobianos. Esse grupo foi denominado de ESKAPE e contém os seguintes micro-organismos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp..

Para este estudo, foram consideradas amostras de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Todos esses gêneros foram isolados nesse trabalho bem como no líquido lixiviado da Odontologia pelo estudo de Vieira *et al* em 2011. Embora *E. coli* não faça parte dessa classificação, o micro-organismo está presente no grupo das principais enterobactérias isoladas nas infecções relacionadas à assistência a saúde (ANVISA, 2013a).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* spp. é formado por 50 espécies, 27 subespécies e pertence à família Staphylococcaceae (EUZEBY, 2015a). São micro-organismos em formato de esferas, Gram-positivos, anaeróbios facultativos, agrupados tipicamente em cachos e encontrados em uma ampla diversidade de ambientes incluindo a microbiota de seres humanos. Acredita-se que a espécie *Staphylococcus epidermidis* compoñha aproximadamente 90% da microbiota indígena da pele e da mucosa humana. Embora seja considerada patogênica, *Staphylococcus aureus* também é capaz de colonizar permanentemente cerca de 30% da população, atuando como uma bactéria comensal (COGEN; NIZET; GALLO, 2008; THE HUMAN MICROBIOME PROJCT CONSORTIUM, 2012; ANVISA, 2013a).

S. aureus é uma das espécies bacterianas mais intensamente estudadas, devido ao fato de ser o agente etiológico de inúmeras doenças humanas e apresentar resistência a diversos antimicrobianos. A espécie é um dos principais causadores de infecções nosocomiais e infecções adquiridas na comunidade e o agente infeccioso geralmente é identificado como a mesma linhagem que se encontra presente no hospedeiro como comensal. Dentre as doenças causadas por *S. aureus* encontra-se bacteremia, pneumonia associada à ventilação mecânica,

endocardite, osteomielite, dentre outras. Somado a isso, o micro-organismo é responsável por doenças mediadas por toxinas, como síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e doenças estafilocócicas transmitidas por alimentos (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

Uma grande variedade de fatores de virulência está presente em *S. aureus*, incluindo componentes estruturais e produtos secretados que participam da patogênese da infecção. *S. aureus* possui uma grande diversidade de proteínas de superfície responsáveis pela ligação bacteriana ao tecido do hospedeiro, dando início ao processo de colonização e infecção. Dentre esses componentes, pode-se citar a Proteína A, que se liga tanto à fibronectina quanto a regiões do endotélio danificadas, podendo, nesse caso, resultar em aderência e indução de doenças endovasculares. Essa estrutura também é responsável pelo impedimento da fagocitose bacteriana por meio da ligação, em uma ‘orientação incorreta’, à Imunoglobulina G. Além disso, estão presentes também a Proteína de ligação ao colágeno, possibilitando a aderência tanto ao próprio colágeno quanto à cartilagem e à Proteína de superfície sensível ao plasma, que participa da ligação com o fibrinogênio e com a fibronectina. Além de se ligar em superfícies bióticas, *S. aureus* produz diversas proteínas codificadas pelo operon *ica* que vão ser responsáveis pela formação de uma matriz polissacarídica, gerando um complexo populacional bacteriano aderido a uma superfície, formando uma estrutura denominada biofilme (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

Outra importante característica da espécie é sua habilidade de secretar hemolisinas (alfa e beta-hemolisinas) e outras enzimas que lisam e digerem diferentes tecidos eucarióticos, necessários para a obtenção de nutrientes para a produção de proteínas que alteram o sistema imune do hospedeiro, como a Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST) e enterotoxinas. Como exemplo, pode-se citar a alfa-hemolisina, que possui características citolíticas para plaquetas e monócitos humanos. *S. aureus* também produz superantígenos com grande poder imuno-estimulatório, levando a uma alta produção de citocinas pelos linfócitos T, podendo causar danos epiteliais e hipotensão. Acredita-se que a principal função dos superantígenos seja enfraquecer o hospedeiro para que o patógeno consiga se disseminar, resultando na propagação da doença. As enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D, E, G e Q são responsáveis pelas intoxicações alimentares e a TSST-1 é a causa da síndrome do choque tóxico (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009; STIEBER *et al.* 2015).

Além dos fatores de virulência, que por si só já são um risco para os hospedeiros colonizados, seja transitoriamente ou permanentemente, *S. aureus* pode conter os genes *blaZ* e *mecA*, que codificam uma β -lactamase e uma proteína de ligação à penicilina alternativa (PBP2a), respectivamente, conferindo resistência aos agentes β -lactâmicos, conforme detalhado nos itens 2.3.1 e 2.3.2.1 deste trabalho (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009; PEREIRA, 2014).

Nos últimos anos, *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) se tornaram altamente prevalentes em hospitais de todo o mundo. Países como Brasil, Estados Unidos, Argentina, Chile, Uruguai, Bolívia e Peru, possuem uma prevalência de MRSA adquiridos em hospitais maior que 50% (STEFANI *et al.*, 2012). Na Europa, em 2011, um estudo realizado com 494 pacientes em unidades de terapia intensiva que estavam colonizados pelo MRSA demonstrou um índice de mortalidade de 29,1%, valor esse que correspondia a 36,4% de todas as mortes ocorridas no hospital (HANBERGER *et al.*, 2011). Na América Latina, além de ser causa importante de infecções nosocomiais, a incidência de MRSA vem aumentando também no que se refere às infecções adquiridas na comunidade. Vários casos já foram reportados no Brasil, no Peru, na Colômbia, na Venezuela e também no Chile (GUZMAN-BLANCO *et al.*, 2009).

2.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* spp. pertence à família Enterobacteriaceae e atualmente é composto por 14 espécies e cinco subespécies (EUZEBY, 2015b). Caracterizam-se pela forma de bastonetes, coloração Gram-negativa e são imóveis, anaeróbios facultativos e fermentadores de lactose. Somado a isso, o micro-organismo apresenta cápsula proeminente de polissacarídeos que é responsável pela aparência mucoide das colônias isoladas (SIKARWAR; BATRA, 2011; LI *et al.*, 2014).

K. pneumoniae é um patógeno oportunista que pode ser encontrado na boca, pele e intestino de seres humanos. A colonização do trato gastrointestinal pelo patógeno normalmente ocorre antes da infecção, a qual geralmente afeta indivíduos imunocomprometidos ou já enfraquecidos por outro processo infeccioso. O micro-organismo também pode ser encontrado em ambientes hospitalares e instrumentos médicos, onde se agrupa em comunidades microbianas denominadas biofilmes (LI *et al.*, 2014).

De acordo com Li *et al* (2014), um dos motivos para a cronicidade das infecções nosocomiais causadas por *K. pneumoniae* é a formação *in vivo* de biofilme, o qual protege o micro-organismo de ataques do sistema imune do hospedeiro e da ação de antimicrobianos. Para que esse biofilme se forme, alguns fatores de virulência são importantes, como a formação de uma cápsula mucoide e a presença de fímbrias (WU *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014).

Descrito como o principal fator de virulência da espécie, a cápsula polissacarídica de *K. pneumoniae* contém 78 sorotipos, alguns deles responsáveis por um fenótipo hiper mucoviscoso (hipervirulento) devido ao aumento de produção dessa estrutura. Aparentemente, o grau de mucosidade está positivamente correlacionado com o sucesso no estabelecimento de infecções invasivas e linhagens hipervirulentas podem afetar indivíduos saudáveis e causar infecções como meningite, fascíte necrosante, pneumonia grave e abscessos hepáticos piogênicos. Além disso, as linhagens hipervirulentas apresentam a habilidade de propagar a infecção de forma metastática, infectando diferentes locais no organismo do hospedeiro (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; LI *et al.*, 2014).

O primeiro passo para a aquisição da infecção por uma linhagem hipervirulenta é a colonização pelo micro-organismo. Entretanto, faltam informações sobre o tempo entre a colonização e a aquisição de uma infecção e não há dados exatos documentando a incidência de infecção por essa linhagem hipervirulenta, já que esse teste não é rotineiramente realizado na prática clínica. Acredita-se que o principal sítio de colonização seja o trato gastrointestinal, seguido da orofaringe e da pele do hospedeiro (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013). De acordo com Wu *et al*, (2011) nos últimos 20 anos, o número de casos de abscessos hepáticos piogênicos causados na comunidade por *K. pneumoniae* aumentou de forma global, sendo mais frequente em países da Ásia como Taiwan, Singapura e Coreia. Embora os mecanismos de diagnóstico e os cuidados médicos tenham evoluído, a infecção ainda é responsável por uma alta taxa de mortalidade entre os pacientes.

Outros fatores de virulência adicionais são importantes para a instauração da infecção por *K. pneumoniae*. Dentre eles, pode-se incluir a presença das fímbrias do tipo I e III, que contribuem com a formação de biofilme principalmente em cateteres urinários; a presença de lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana externa (LI *et al.*, 2014).

Outro fator citado por Li *et al* (2014) como causa da cronicidade das infecções provocadas por *K. pneumoniae* é a presença de β -lactamases de espectro estendido (do inglês

Extended spectrum beta-lactamase - ESBLs) ou de carbapenemases, diminuindo as opções de antimicrobianos para o tratamento. Em estudo realizado em 2013 por Garcia *et al.*, *K. pneumoniae* foi o micro-organismo predominantemente isolado em infecções nosocomiais em um hospital no norte de Minas Gerais e todas as amostras avaliadas dessa espécie apresentaram um fenótipo positivo para a presença de ESBLs. Na Europa, o número de *K. pneumoniae* multirresistente vem aumentando ao longo dos anos e gerando preocupação por parte do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (do inglês *European Center for Disease Prevention and Control* - ECDC). O principal motivo é a crescente resistência adquirida aos carbapenêmicos, principalmente em países do sul do continente (ECDC, 2013). Linhagens com esse fenótipo de resistência também foram encontradas no líquido lixiviado a partir dos resíduos de serviços de saúde da Odontologia por Vieira *et al* em 2011. Das amostras de *K. pneumoniae* isoladas no estudo, 96,4% apresentava taxa elevada de resistência à penicilina e 36,3% delas foram consideradas produtoras de ESBL.

2.2.3 *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* spp. pertence à família Moraxellaceae e é composto por 41 espécies (EUZEBY, 2015c). Os micro-organismos pertencentes a esse gênero apresentam forma cocobacilar, coloração Gram-negativa, imobilidade, são aeróbias e não-fermentadoras de glicose (VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011).

A ubiquidade é uma característica do gênero e suas espécies podem ser facilmente isoladas do solo, água e alimentos. Além disso, amostras de *Acinetobacter* spp. também são encontradas na microbiota da pele de seres humanos e podem ser isoladas principalmente em ambientes clínicos como comensais da pele de pacientes e de funcionários do hospital. De acordo com Giamarellou, Antoniadou e Kanellakopoulou (2008), um estudo epidemiológico avaliou a colonização da pele humana por *Acinetobacter* spp. e revelou que mais de 40% dos voluntários saudáveis estavam colonizados pelo gênero, sendo *A. lwoffii* a espécie predominante. Peleg, Seifert e Paterson (2008) corroboram esse estudo, confirmando a predominância da espécie *A. lwoffii* em 43% de peles e mucosas de pacientes hospitalizados, seguida de *A. johnsonii* (20%), *A. junii* (10%), entre outros. O gênero também pode ser encontrado no trato respiratório de pacientes, bem como na garganta de aproximadamente 10% de indivíduos com alto consumo de álcool na comunidade (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008).

Os micro-organismos do gênero *Acinetobacter* foram considerados, no passado, como de baixa virulência. Com o surgimento de alguns casos de pneumonias adquiridas na comunidade causados por esse micro-organismo, indícios de que *Acinetobacter* spp. era potencialmente patogênico e capaz de causar doenças invasivas começaram a surgir. Dentre os fatores de virulência presentes nesse gênero pode-se citar a presença de fímbrias, produção de sideróforos e a presença de LPS, o qual é responsável pela toxicidade letal em camundongos infectados. O principal fator de virulência presente em *Acinetobacter* é a produção de Substância Polimérica Extracelular (do inglês EPS), responsável pela proteção da bactéria contra o sistema imune do hospedeiro. Acredita-se que cerca de 30% das linhagens de *Acinetobacter* produzam essa substância, e, aquelas que são produtoras, demonstraram ser mais virulentas do que as não produtoras (JOLY-GUILLOU, 2005).

Acinetobacter baumannii é a espécie mais comumente envolvida em infecções nosocomiais, incluindo quadros de pneumonias e bacteremias (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). A relevância clínica da espécie tem sido justificada principalmente pelos seus mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência aos antimicrobianos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Somado a isso, a espécie é capaz não apenas de sobreviver por vários dias em superfícies inanimadas secas, empoeiradas, com escassez de nutrientes e presença de antimicrobianos como também de formar biofilmes sobre essas superfícies, apresentando propriedades de sobrevivência importantes capazes de aumentar seu papel nas infecções relacionadas à assistência à saúde (TOMARAS *et al.*, 2003; GADDY; ACTIS, 2009).

Outras espécies do gênero também são capazes de causar infecções nosocomiais, como *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, entre outras. Essas infecções estão normalmente relacionadas ao uso de cateteres e são mais raras, causando menor mortalidade quando comparadas com aquelas causadas por *A. baumannii*. Os raros surtos causados por essas espécies (*A. junii*, por exemplo) podem estar também relacionadas a fluidos de infusão contaminados, conforme citado por alguns autores (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011).

2.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas spp. é um gênero de bacilos Gram-negativos, móveis, não fermentadores composto de 226 espécies e 18 subespécies de micro-organismos, pertencentes à família Pseudomonadaceae (ANVISA, 2013a; EUZEBY, 2015d).

Dentre as bactérias presentes no gênero, *P. aeruginosa* é a mais bem estudada por ser um micro-organismo oportunista e o agente etiológico de diversas infecções nosocomiais. A ubiquidade, a qual possibilita que a espécie colonize diversos nichos e hospedeiros, é uma habilidade importante e só é possível em função da sua versatilidade metabólica e aos genes de virulência no seu genoma (VALOT *et al.*, 2015). Em hospedeiros humanos, *P. aeruginosa* pode fazer parte da microbiota do ouvido externo, principalmente de pacientes que possuem diabetes *mellitus* (HULL; CHOW, 2007).

Inúmeros são os fatores de virulência presentes em *P. aeruginosa*, dentre os quais destacam-se a presença de proteases, capazes de degradar imunoglobulinas e fibrinas, além de romper as junções das células epiteliais; LPS, causando um processo inflamatório sistêmico e o sistema de secreção tipo III, capaz de injetar a toxina bacteriana dentro da célula do hospedeiro, aumentando as chances de mortalidade do paciente infectado (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

A presença de *pili* e flagelo, além de funcionarem como mecanismos de motilidade, são importantes fatores para a adesão celular e para a formação de biofilme. Outro fator de virulência relacionado ao biofilme é a produção de EPS, cuja função é encobrir a comunidade bacteriana e conferir uma robustez química e física aos micro-organismos, resistindo contra forças mecânicas, como águas correntes e substâncias químicas, tais como antimicrobianos e outras soluções químicas. Três polissacarídeos são produzidos para a formação do EPS e a importância e contribuição de cada um deles varia de acordo com a linhagem. O alginato normalmente é superproduzido em linhagens mucoides, o polissacarídeo Pel é produzido por praticamente todas as linhagens, enquanto o Psl não é codificado em todas os micro-organismos dessa espécie (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

A resistência do biofilme bacteriano aos antimicrobianos e aos desinfetantes contribui para a sua resiliência, sendo, dessa forma, classificado como o principal problema de assistência à saúde encontrado atualmente. Além de poder se estabelecer em equipamentos médicos, *P. aeruginosa* pode se disseminar produzindo biofilmes no epitélio de hospedeiros

durante infecções crônicas, particularmente em pacientes com fibrose cística (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Além da virulência e da sua habilidade de adaptação em diversos ambientes, a capacidade de *P. aeruginosa* de causar doenças, principalmente em pacientes imunocomprometidos, também está relacionada à sua resistência aos antimicrobianos (LOVEDAY *et al.*, 2014). Em 2013, o ECDC publicou dados epidemiológicos anuais sobre infecções associadas a centros de atenção à saúde e sobre o perfil de resistência antimicrobiana no continente Europeu. Nesse estudo, *P. aeruginosa* se encontra como um dos micro-organismos predominantemente isolados em infecções, sendo o principal agente etiológico de pneumonias em pacientes internados, além de ser responsável por 7,9% das bacteremias e 12,5% das infecções de trato urinário. Altas porcentagens de *P. aeruginosa* resistentes a aminoglicosídeos, ceftazidima, fluoroquinolonas, piperacilina/tazobactam e carbapenêmicos foram relatadas em diversos países. A resistência aos carbapenêmicos apresentou valores superiores a 10% das amostras isoladas em 19 dos 29 países do estudo e linhagens multidroga resistentes também foram reportadas e representaram mais de 15% do total isolado. Garcia *et al.*, em 2013, também avaliaram o perfil de resistência de amostras de *P. aeruginosa* isoladas em um hospital de Minas Gerais. De acordo com esse estudo, as amostras foram resistentes a imipenem, meropenem, gentamicina, amicacina, ciprofloxacina, cefepime e piperacilina/tazobactam. Outro estudo realizado em cinco hospitais de Belo Horizonte detectou altas taxas de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima, cefepima, piperacilia/tazobactam, além de aminoglicosídeos e carbapenêmicos. Das 40 amostras isoladas de pacientes com quadro de bacteremia, quase todas foram positivas para genes codificadores de metalobetalactamases (MβLs) testados (INÁCIO *et al.*, 2014).

2.2.5 *Escherichia coli*

A espécie *E. coli* é classificada como um bacilo Gram-negativo, móvel por flagelos peritríquios ou imóvel, anaeróbio facultativo capaz de fermentar glicose e, em sua maioria, lactose. Pertence à família Enterobacteriaceae, a qual é composta por apenas oito espécies e nenhuma subespécie é conhecida (FRANCO, 2002; ANVISA, 2013a; EUZEBY, 2015e).

O trato gastrointestinal de recém-nascidos é colonizado por *E. coli* poucas horas após o seu nascimento. Essas bactérias são normalmente encontradas no intestino grosso (cólon) de seres humanos e animais homeotérmicos, constituindo aproximadamente 80% da microbiota

aeróbia presente nesse sítio. Usualmente, a espécie mantém uma relação comensal com o hospedeiro, apresentando funções biológicas de supressão de bactérias nocivas e produção de vitamina K (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KORB *et al.*, 2013).

De forma preocupante, algumas linhagens de *E. coli* adquiriram fatores de virulência que permitiu-lhes causar uma grande variedade de doenças. Esses fatores são frequentemente codificados em elementos genéticos que podem ser mobilizados e transferidos entre diferentes linhagens, gerando três diferentes ‘patótipos’ capazes de causar os seguintes quadros clínicos: doenças entéricas/diarreio gênicas, infecções do trato urinário e sepse/meningite. Dentre os principais fatores de virulência presentes nas linhagens patogênicas encontram-se diferentes tipos de adesinas que permitem que o micro-organismo colonize sítios nos quais a espécie normalmente se encontra ausente; a presença de LPS que, em contato com receptores celulares do hospedeiro, pode ativar cascatas de citocinas levando a um quadro de choque séptico e a secreção de toxinas que afetam uma variedade de processos fundamentais nas células eucarióticas como inibição da síntese proteica, indução de apoptose, entre outros (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

De acordo com a ANVISA (2013a), *E. coli* está presente no grupo das principais enterobactérias isoladas nas infecções relacionadas à assistência a saúde. Nos Estados Unidos, a espécie é o quinto agente etiológico mais frequentemente isolado em infecções na corrente sanguínea e o primeiro micro-organismo entre os Gram-negativos, levando a uma taxa de mortalidade de 22%. Além de infecções no ambiente hospitalar, a espécie também é classificada como um dos principais patógenos causadores de infecção urinária na comunidade (RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2010; ANVISA, 2013a).

Em concordância com os autores citados acima, o ECDC em 2013, afirmou que *E. coli* está entre as bactérias Gram-negativas mais frequentemente isoladas em hemoculturas, além de ser a maior causa de infecções urinárias tanto na comunidade quando em ambientes de assistência à saúde europeus. O estudo também alertou sobre o aumento da incidência de amostras de *E. coli* multirresistentes a antimicrobianos nos últimos quatro anos em mais de um terço dos países da União Europeia. De forma preocupante, Korb (2013) afirma que as linhagens comensais também começaram a adquirir resistência à maioria dos antimicrobianos, principalmente à ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol. Na década de 90, a resistência à ampicilina e à amoxicilina aumentou de 20% para 40% e, embora a resistência às

fluoroquinolonas tenha permanecido baixa, houve também um aumento visível ao longo dos anos.

2.2.6 *Candida* spp.

O gênero *Candida* é, sem dúvida, o principal grupo de leveduras causador de quadros infecciosos no ambiente hospitalar. As espécies podem fazer parte da microbiota indígena de seres humanos, colonizando a cavidade oral, mucosa vaginal, região perianal e trato gastrointestinal. Em pacientes debilitados, o gênero pode causar candidíase, uma doença com manifestações clínicas variadas que pode levar ao aparecimento de lesões na boca, pele, sistema broncopulmonar, intestinal e região perianal. Ocasionalmente, o micro-organismo pode causar endocardites, fungemia, meningite, entre outras infecções em diferentes sítios do hospedeiro (ANVISA, 2013b).

Os principais estudos abordando fatores de virulência no gênero são voltados para a espécie *C. albicans*, devido à patogenicidade desse micro-organismo. Dentre esses fatores, destaca-se o dimorfismo da espécie, com a formação de pseudohifas, tornando-a mais invasiva; a presença de adesinas, as quais mediam a aderência da espécie a outros micro-organismos, às células do hospedeiro ou a uma superfície abiótica; a formação de biofilme em superfícies bióticas ou abióticas, protegendo a espécie do sistema imune do hospedeiro e da ação de antimicrobianos e a secreção de hidrolases, facilitando a penetração ativa das células fúngicas. Embora presentes em pequenas quantidades, alguns estudos abordam a virulência de *Candidas* não-*albicans*, que pode variar de acordo com a espécie, sítio de infecção, reação do hospedeiro, entre outros. Dentre os fatores de virulência presentes nesses micro-organismos, encontram-se a expressão de enzimas extracelulares, contribuindo para a invasão tecidual, colonização e progressão da infecção; adesinas, alterações fenotípicas e formação de biofilme, contribuindo dessa forma para a patogênese da candidíase (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

Embora a maioria das infecções fúngicas seja atribuída à *C. albicans*, nos últimos anos as espécies não-*albicans* vêm sendo importantes agentes etiológicos de infecções nosocomiais. O principal problema da emergência dessas espécies é a diversidade de níveis de resistência aos antimicrobianos comumente usados na prática clínica. O aumento do uso de cateteres venosos, nutrição parenteral, antimicrobianos de amplo espectro e quimioterapias contribuíram para o aumento das infecções causadas por *Candida* spp., sendo essas um

desafio para a sobrevivência de pacientes com um quadro clínico grave e pacientes em pós-operatório (ANVISA, 2013b; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

Nos EUA, espécies de *Candida* spp. são notificadas como o sexto patógeno predominantemente envolvido em infecções nosocomiais e a quarta causa mais prevalente de infecções de corrente sanguínea. No Brasil, as espécies não-*albicans* mais prevalentes em casos de fungemia são *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*. Em 2012, o primeiro relato de candidemia causado por *C. haemulonii* ocorreu em São Paulo, sendo essa espécie raramente encontrada em infecções humanas. Acredita-se que as infecções causadas por *Candida* spp. têm origem endógena e que espécies não-*albicans* normalmente são capazes de causar infecções invasivas quando há uma redução da população de *C. albicans* em uma determinada região no hospedeiro (SHEHABI; NAZZAL; DAJANI, 2004; COLOMBO *et al.*, 2006; ALMEIDA JR *et al.*, 2012; ANVISA, 2013b).

2.3 Resistência aos antimicrobianos

Desde a sua introdução clínica, na década de 1930, os antimicrobianos foram considerados como o principal marco da medicina moderna, promovendo a cura para diversas doenças prevalentes na época. Nos trinta anos seguintes à sua introdução, houve um crescente aumento na descoberta de novos antimicrobianos, ampliando a diversidade de escolha para o tratamento de inúmeras doenças infecciosas (POWERS, 2004). Entretanto, o uso indiscriminado desses medicamentos aplicou uma pressão seletiva nos micro-organismos e linhagens multirresistentes ameaçam colocar fim na ‘era dos antibióticos’. Aliado a isso, nas últimas duas décadas o investimento para o desenvolvimento de novos antimicrobianos vem sendo reduzido, podendo gerar consequências na saúde pública, em escala global (PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013).

Para se avaliar o perfil de resistência desses micro-organismos, diversas definições para bactérias multidroga-resistentes (MDR), extensamente resistentes (XDR) e pan-resistente a drogas (PDR) têm sido utilizadas na literatura. Com o objetivo de padronizar essa terminologia, diferentes estudiosos se reuniram por uma iniciativa do ECDC e do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para descrever o perfil de resistência de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., bactérias da família Enterobacteriaceae (além de *Salmonella* e *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., todos frequentemente responsáveis por infecções relacionadas à assistência à saúde. Categorias de antimicrobianos

epidemiologicamente relevantes foram construídas para cada bactéria e os critérios de susceptibilidade foram baseados nos pontos de corte do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e do *United States Food and Drug Administration* (FDA) (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

De acordo com os autores, MDR foi definido como resistência a pelo menos um agente de três categorias de antimicrobianos; XDR concentram os micro-organismos resistentes a pelo menos um agente de todas as categorias, exceto duas categorias ou menos; PDR foi definido como resistência a todos os agentes em todas as categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Durante bilhões de anos, as bactérias vêm desenvolvendo mecanismos intrínsecos e extrínsecos para evitar, expulsar, destruir ou resistir a compostos semelhantes aos antimicrobianos utilizados atualmente. A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana está relacionada às suas características funcionais ou estruturais. Já os mecanismos extrínsecos são adquiridos por transferência horizontal de genes mobilizados via plasmídeo conjugativo, transposons, sequências de inserção e recombinação de ácido desoxirribonucleico (DNA) exógeno ou causado por mutações cromossômicas aleatórias, quando expostos a doses subterapêuticas de antimicrobianos que irão atuar no aumento da taxa de mutação e a seleção por linhagens resistentes (PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013; BLAIR *et al.*, 2015).

As bactérias podem apresentar vários mecanismos de resistência contra um ou múltiplos agentes antimicrobianos, dentre os quais os principais são o impedimento da entrada da droga na célula bacteriana, seja pela redução da permeabilidade ou pela redução de porinas; a inativação do medicamento por enzimas; a modificação no alvo, impedindo a interação com o antimicrobiano; e a superexpressão de bombas de efluxo que transportam vários antimicrobianos para fora da célula (MARTINEZ; BAQUERO, 2009; BLAIR *et al.*, 2015).

A resistência a antimicrobianos também pode aumentar a virulência de certas espécies em determinados ambientes, frequentemente auxiliando essas linhagens a colonizar novos nichos e até a substituir a microbiota comensal. Em ambientes onde a pressão seletiva por antimicrobianos está presente, patógenos oportunistas são capazes de colonizar o local devido a sua habilidade de adquirir ou desenvolver mecanismos de resistência, modificando a

evolução natural bacteriana com a redução das linhagens sensíveis a estes (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Atualmente, a resistência aos antimicrobianos vem sendo considerada como a maior ameaça à saúde humana. Estima-se que 25.000 pessoas morrem todo ano na Europa devido às infecções causadas por bactérias MDR, levando a um custo anual de € 1,5 bilhões para o continente. Nos EUA, mais de 2 milhões de pessoas são infectadas com bactérias resistentes, as quais são responsáveis pelo óbito de 23.000 pacientes (BLAIR *et al.*, 2015).

2.3.1 Gene *mecA*

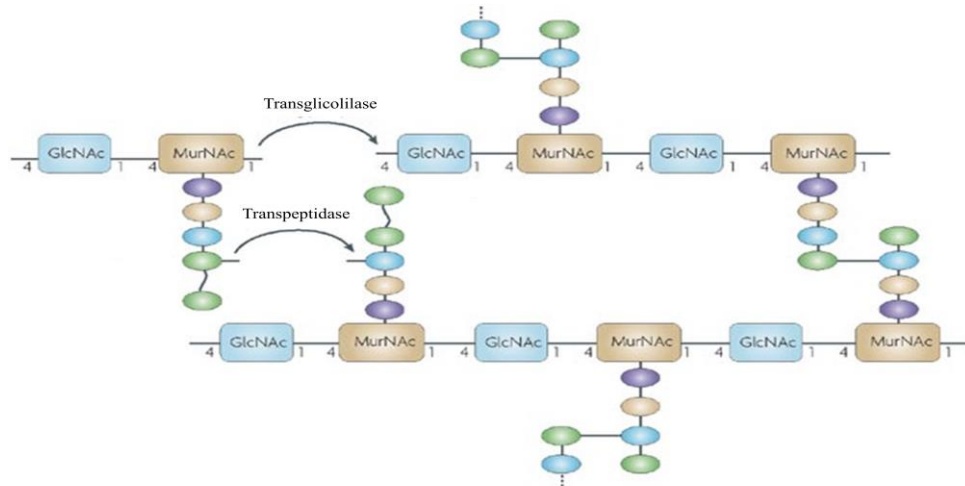
Infecções causadas por MRSA foram primeiramente detectadas em ambientes hospitalares e, nos últimos anos, essas linhagens também começaram a causar doenças em indivíduos na comunidade. A taxa de mortalidade associada a linhagens invasivas de MRSA é de cerca de 20%, podendo variar entre os diversos estudos. A resistência à meticilina é derivada da aquisição do gene *mecA*, não nativo nessa espécie, o qual irá codificar uma proteína modificada responsável pela formação da parede bacteriana que possui uma baixa afinidade pelos β -lactâmicos (STEFANI *et al.*, 2012).

A parede celular de Gram-positivos é formada por uma malha rígida de cadeias lineares de dissacarídeos, N-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc), ligados entre si por uma ligação beta-1,4 e conectados de forma cruzada por pontes peptídicas. Para que haja a extensão da cadeia de dissacarídeos, é necessária a formação de ligações beta-1,4 pela enzima transglicosilase e, para que a ligação cruzada entre os peptídeos se forme, é necessária a presença da enzima transpeptidase. Essas enzimas fazem parte de um grupo chamado proteínas de ligação à penicilina (PBPs) que contém enzimas de alto peso molecular, que possuem atividade tanto de transglicosilase quanto de transpeptidase e as PBPs de baixo peso molecular (tais como PBP2), exibindo apenas a função de transpeptidase, conforme demonstrado na Figura 2 (STAPLETON; TAYLOR, 2002; THANBICHLER; SHAPIRO, 2008).

Quando ocorre a exposição aos β -lactâmicos, estes se ligam às PBPs, inibindo a transpeptidação e, conseqüentemente, a formação de pontes peptídicas. Dessa forma, a parede celular do micro-organismo se tornará mecanicamente fraca, levando a morte celular. Algumas linhagens adquiriram resistência a esses antimicrobianos, as quais se diferem das linhagens sensíveis por possuir o gene *mecA*, presente no cromossomo do micro-organismo.

Esse gene é transferido horizontalmente por meio de um cassete gênico denominado *SCCmec* e é responsável pela codificação da PBP2a, uma enzima modificada que possui uma baixa afinidade por β -lactâmicos, permitindo, dessa forma, que a ponte peptídica ocorra normalmente (STAPLETON; TAYLOR, 2002; THANBICHLER; SHAPIRO, 2008).

Figura 2 – PBPs responsáveis pela formação da parede celular.



Legenda: GlcNAc: N-acetilglicosamina; MurNAc: ácido N-acetilmurâmico. Adaptado de Thanbichler; Shapiro, 2008.

2.3.2 Genes codificadores de β -lactamases

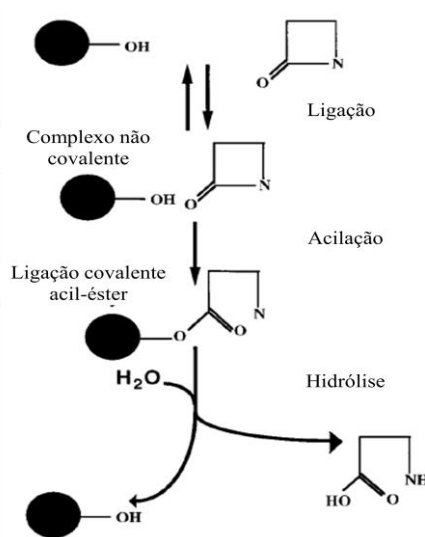
A resistência mediada por β -lactamases vem sendo o principal mecanismo de resistência estudado na história das doenças infecciosas bacterianas. Embora novas penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos mais estáveis tenham sido desenvolvidos buscando contornar a inativação das enzimas, novas β -lactamases foram surgindo e hidrolisando os novos compostos. Atualmente, essas enzimas são responsáveis pela resistência bacteriana a múltiplas drogas e são encontradas em espécies Gram-positivas, sendo secretadas no meio extracelular ou estando aderidas à membrana citoplasmática e em Gram-negativas, em sua maioria presentes no ambiente periplasmático (LIVERMORE, 1995; BUSH; FISHER, 2011).

Muitas espécies de enterobactérias e bactérias Gram-negativas não fermentadoras produzem β -lactamases de origem cromossomal, entretanto aquelas que possuem a habilidade de transferência são consideradas as mais preocupantes (BUSH; FISHER, 2011). O uso

indiscriminado de antimicrobianos levou a evolução de patógenos contendo múltiplos genes codificadores de β -lactamases, as quais podem estar aliadas a outros mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos (BUSH, 2013).

As β -lactamases tem como alvo o anel β -lactâmico do antimicrobiano. Conforme demonstrado na Figura 3, a enzima irá se associar de forma não covalente com o antimicrobiano e, então, o radical hidroxila da cadeia de serina, presente no sítio ativo da enzima, forma uma ligação covalente acil-éster. Por fim, o éster formado sofre hidrólise, liberando a enzima ativa e o antimicrobiano que se encontra hidrolisado e inativado. Esse mecanismo ocorre nas β -lactamases de classe molecular A, C e D (melhores descritas a seguir), enquanto a classe B utiliza o íon de Zinco para se ligar ao anel β -lactâmico (LIVERMORE, 1995).

Figura 3 – Mecanismo de ação das β -lactamases



Fonte: Adaptado de Livermore, 1995.

Para definir a nomenclatura das β -lactamases, Amber propôs em 1980 uma classificação baseada nas sequências de aminoácidos presentes nas enzimas. O autor as separou em quatro classes moleculares denominadas A, B, C e D, baseando-se na conservação e na distinção dos aminoácidos entre os grupos. As classes A, C e D incluem enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico por meio de um sítio ativo de serina e o grupo B, das metaloenzimas, contém um íon zinco no sítio ativo enzimático, que facilita a hidrólise do antimicrobiano. A classe C é a maior dentre o grupo das serinas por possuir cerca de 360

aminoácidos, enquanto as classes A e D possuem menos de 310 (BUSH; FISHER, 2011; BUSH; JACOBY, 2010; BUSH, 2013).

Uma nova classificação proposta por Bush e Jacoby se baseou nos perfis do substrato e na sua inibição por fármacos inibidores de β -lactamases para criar grupos mais funcionais permitindo a correlação das enzimas com o seu fenótipo (BUSH; JACOBY, 2010). O Quadro 1 demonstra as classificações das β -lactamases pelos autores.

Quadro 1 – Classificação das β -lactamases segundo Bush-Jacoby e Amber.

Bush-Jacoby (2009)	Classe Molecular	Substratos Preferenciais	Inibido por		Enzimas Representativas
			CLA ou TZB	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	Não	Não	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	Não	Não	GC1, CMY-37
2 ^a	A	Penicilinas	Sim	Não	PC1
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas de baixo espectro	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos	Sim	Não	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	Não	Não	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos	Não	Não	TEM-50
2c	A	Carbencilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbencilina, Cefepime	Sim	Não	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Não	CepA
2f	A	Carbapenêmicos	Variável	Não	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	CphA, Sfh-1

Legenda: CLA: ácido clavulânico; TZB: tazobactan; EDTA: ácidoetilenodiaminicotetrácetico. Fonte: Adaptado de BUSH; JACOBY, 2010.

Atualmente, mais de 1.000 β -lactamases foram descritas na literatura, sendo as mais prevalentes aquelas presentes na classe funcional 2, classe molecular A, possuindo mais de 550 enzimas. Entre essas β -lactamases, existem pelo menos 40 variantes na família TEM e SHV, com pequenas modificações de aminoácidos, sem conferir um fenótipo de resistência adicional quando comparado com as enzimas TEM-1 e SHV-1. Embora menos prevalentes, as classes moleculares C (classe funcional 1) e D (classe funcional 2d) vem apresentando um rápido crescimento, de pelo menos 130% nos últimos anos. O número de variantes TEM, IMP e SHV tiveram pequenos crescimentos quando comparados com OXA, CTX-M e VIM, que dobraram o seu número desde 2005 (BUSH; FISHER, 2011).

2.3.2.1 *BlaZ*

A resistência à penicilina em *S. aureus* está presente em cerca de 90% das espécies isoladas em seres humanos e é manifestada predominantemente pela produção de β -lactamases codificadas pelo gene *blaZ*. Esse gene possui apenas quatro variantes (A, B, C e D) que normalmente são identificadas por métodos imunológicos (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006; PEREIRA *et al.*, 2014).

A região responsável pela síntese da β -lactamase contém, além do gene *blaZ*, o gene *blaR1* (que codifica um transdutor de sinal transmembrana) e o gene *blaI* (que codifica o repressor). Acredita-se que o β -lactâmico se ligue à parte extracelular do BlaRI, causando uma mudança conformacional que induz a atividade proteolítica de BlaRI intracelulares. Com isso, o repressor *blaI* é clivado pela protease BlaRI, impedindo com que ele se ligue no operador e permitindo a síntese do gene *blaZ* e, conseqüentemente, da β -lactamase (CLARKE; DYKE, 2001).

2.3.2.2 β -lactamases de espectro-estendido: TEM, SHV e CTX-M

O termo ESBL foi inicialmente aplicado em 1987 às enzimas da família TEM e SHV que eram capazes de hidrolisar as cefalosporinas de espectro estendido, para diferenciá-las de algumas variantes dessa família que não exibiam esse perfil (LIVERMORE, 2008). As ESBLs estão incluídas no grupo funcional 2be, classe molecular A, e retêm a atividade contra as penicilinas e cefalosporinas do subgrupo 2b além de hidrolisar novas cefalosporinas de

espectro estendido (ceftazidima e cefotaxima) e monobactâmicos (aztreonam), conforme demonstrado no Quadro 1 (BUSH; JACOBY, 2010; LEE; BAE; LEE, 2012).

Os mais comuns gêneros bacterianos que carregam os genes das ESBLs são *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Shigella* sp. e *Salmonella* sp.. As ESBLs, especialmente as da família TEM e SHV, das quais a maioria das enzimas é derivada, acumulam mutações genéticas de forma gradual para resistir aos β -lactâmicos e se dissipar ao redor do mundo. (THAI; PLEISS; 2010; GESER; STEPHAN; HÄCHLER, 2012; TISSERA; LEE, 2013). Acredita-se que os genes das enzimas TEM e CTX-M são os mais dispersos entre micro-organismos presentes na população humana, enquanto os genes da família SHV estão presentes apenas em algumas infecções (TISSERA; LEE, 2013).

As enzimas TEM e SHV foram isoladas a primeira vez na década de 1980, na Europa, e são predominantemente encontradas em *Klebsiella* spp., seguido de amostras de *E. coli*, onde se localizam no plasmídeo bacteriano. Em 2014, 186 variantes foram descritas para SHV, comparado com 219 variantes para a enzima TEM e 157 para CTX-M. (METRI; JYOTHI; PEERAPUR, 2012; ROSCHANSKI *et al.*, 2014).

As enzimas CTX-M, também mediadas por plasmídeos, constituem uma família de rápido crescimento dentro das ESBLs, com um impacto clínico significativo. O gene pode ser encontrado em pelo menos 26 espécies bacterianas, especialmente em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Além disso, é bem documentada a associação do gene com a sequência de inserção *ISEcp1* em amostras de *E. coli*, o que aumenta as chances da transferência desse gene de resistência para outros micro-organismos (ZHAO; HU, 2013).

2.3.2.3 Metallo- β -lactamases: GIM, VIM, IMP, SPM

As metallo- β -lactamases (MBLs) se diferem estruturalmente das outras β -lactamases por possuírem um íon de zinco no sítio ativo da enzima. Funcionalmente, o grupo foi primariamente diferenciado devido à sua habilidade de hidrolisar carbapenêmicos, embora atualmente outras enzimas já adquiriram essa capacidade. Em contraste com as ESBLs, as MBLs têm uma baixa capacidade de hidrolisar monobactâmicos, não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam e são inativadas por quelantes de íons metálicos, como o EDTA (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH, 2013).

As primeiras MBLs foram identificadas no cromossomo de bactérias Gram-positivas e ocasionalmente em bacilos Gram-negativos, como *Bacteroides fragilis* ou *Stenotrophomonas*

maltophilia. Quando os genes começaram a surgir em elementos móveis, várias famílias contendo enzimas com diferentes mutações foram originadas e disseminadas entre diversos micro-organismos (BUSH; JACOBY, 2010). Dentre os tipos de MBLs, destacam-se IMP, VIM, SPM e GIM (HONG *et al.*, 2015).

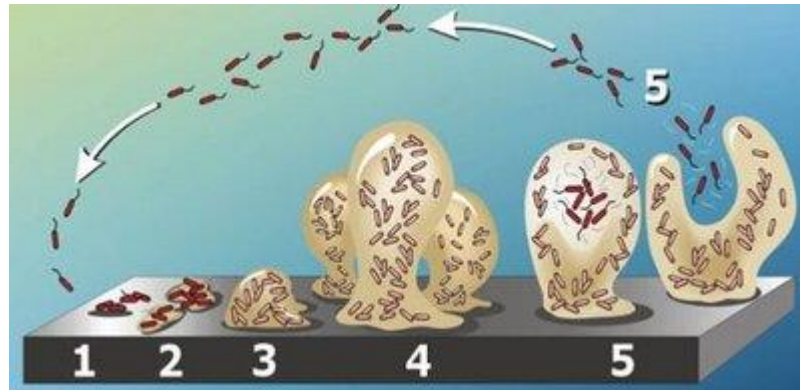
A primeira enzima IMP foi isolada de *P. aeruginosa* no Japão, em 1988, juntamente com uma integrase, ambas contidos em um plasmídeo conjugativo. Dividindo o mesmo espectro hidrolítico das enzimas IMP, estão as MBLs VIM que foram isoladas pela primeira vez em amostras de *P. aeruginosa* na Itália, em 1999 e que vem sendo relatadas em outras bactérias Gram-negativas em diferentes países no mundo (HONG *et al.*, 2015). MBLs do tipo IMP e VIM continuam a prosperar no ambiente clínico, causando surtos em vários países da Europa e Ásia (BUSH, FISHER, 2011).

A primeira enzima SPM foi isolada em 1997, no Brasil, em uma amostra de *P. aeruginosa* resistente a todos os antimicrobianos disponíveis, exceto colistina. O gene *bla*SPM-1 também foi isolado em amostras de *Acinetobacter* spp. de vários hospitais no Brasil, contribuindo para um alto nível de resistência a carbapenêmicos na América do Sul. Em 2002, a MBL GIM foi isolada na Alemanha e inicialmente acreditava-se que ela não seria codificada por genes contidos em elementos genéticos móveis. Entretanto, tempos depois, a mesma enzima foi isolada em *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter freundii* (HONG *et al.*, 2015).

2.4 Formação de biofilmes

Os biofilmes são conjuntos complexos de micro-organismos envolvidos em uma matriz de EPS. Essa matriz pode conter DNA extracelular, proteínas, polissacarídeos, fagos, dentre outros componentes, servindo como um escudo de proteção à comunidade contra predadores, forças mecânicas como água corrente e agentes químicos (McDOUGALD *et al.*, 2011; GELLATLY; HANCOCK, 2013). Cinco etapas são necessárias para que haja a formação de um biofilme maduro, conforme mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Formação e desenvolvimento de biofilmes



Fonte: <http://primalbrasil.com.br/doencas-do-intestino-parte-iv-restaurando-uma-flora-intestinal-saudavel/>

Conforme a Figura 4, a fase inicial (1) começa com células planctônicas se aderindo à superfície (biótica ou abiótica) por meio de adesinas, flagelos e *pili*. Na fase de desenvolvimento (2), as células se alteram fenotipicamente, reprimindo a expressão de flagelos e *pili*, agora não mais necessários, e iniciam a formação do EPS para se aderir “irreversivelmente” à superfície. Na fase 3, as células sésseis se agrupam continuamente e se multiplicam, iniciando a etapa de amadurecimento do biofilme, com a formação da sua arquitetura. A fase madura (4) já apresenta uma arquitetura totalmente amadurecida, podendo adquirir, algumas vezes, um formato de cogumelo. Por fim, na fase de disseminação (5), algumas células no interior do biofilme readquirem as suas estruturas responsáveis pela mobilidade e o biofilme se rompe, dispersando-as no ambiente externo para que o ciclo se reinicie em outra superfície (STOODLEY *et al.*, 20002; PEREIRA, 2013).

Bactérias que vivem em biofilmes são normalmente 10 a 100 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos quando comparadas com sua forma planctônica. Acredita-se que o EPS reduza a capacidade de penetração do antimicrobiano no biofilme, atuando como uma barreira para sua difusão. Além disso, ele também é responsável pela interação química com esses agentes, resultando no sequestro de alguns antimicrobianos, impedindo, dessa forma, a sua atuação. Outra função do EPS é dificultar o reconhecimento do biofilme pelo sistema imune do hospedeiro, já que o mesmo reveste e protege as células bacterianas no seu interior contra anticorpos, radicais livres e outros compostos secretados pelos fagócitos (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

A presença de biofilme está associada a aproximadamente 80% de todas as infecções adquiridas no mundo, principalmente aquelas envolvendo biomateriais (TRENTIN;

GIORDANI; MACEDO, 2013). A formação de biofilme nessas superfícies as tornam um reservatório de patógenos que podem, então, ser uma fonte em potencial de contaminação cruzada (ABDALLAH *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil microbiano de resíduos potencialmente infectantes, sítios anatômicos e vestimentas de profissionais e seus conhecimentos de biossegurança em um serviço de atenção odontológica.

3.2 Objetivos específicos

- Levantar dados sociodemográficos, informações sobre acondicionamento e manipulação de resíduos e medidas de precaução padrão dos profissionais que compõe a equipe de gerenciamento dos resíduos.
- Coletar e isolar amostras microbianas provenientes dos resíduos potencialmente infectantes e de funcionários que os manuseiam.
- Identificar, por métodos fenotípicos automatizados, as espécies clinicamente relevantes isoladas nos resíduos infectantes e nos funcionários.
- Identificar, por métodos fenotípicos automatizados, o perfil de resistência de amostras bacterianas clinicamente relevantes isoladas tanto dos resíduos infectantes como de funcionários que os manuseiam.
- Determinar a presença dos genes codificadores de ESBL *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} nas amostras isoladas de enterobactérias e em bacilos Gram-negativos não fermentadores.
- Pesquisar a presença dos genes codificadores de MBL *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM} em amostras isoladas de enterobactérias e em bacilos Gram-negativos não fermentadores.
- Identificar a presença do gene *mecA* e *blaZ* nas amostras isoladas de *S. aureus*.
- Caracterizar as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* filogeneticamente.
- Detectar a formação de Substância Polimérica Extracelular em amostras de *P. aeruginosa* e a hipervirulência de *K. pneumoniae* bem como realizar o ensaio da formação de biofilme *in*

vitro e quantificar sua produção após quatro, 24 e 48 horas de incubação a 37°C e em temperatura ambiente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Questionário aplicado aos funcionários

Um questionário abordando dados sociodemográficos, informações sobre acondicionamento e manipulação de resíduos e medidas de precaução padrão foi aplicado em todo o corpo de funcionários responsáveis pela limpeza e desinfecção das superfícies e pela coleta dos resíduos de uma instituição pública de assistência à saúde odontológica. O instrumento foi desenvolvido por Oliveira (2013), sofreu adaptações para ser utilizado neste trabalho e pode ser encontrado no Anexo A. Antes da sua aplicação, um estudo piloto foi realizado em um pequeno grupo e a entrevista foi voluntária, anônima e confidencial, abrangendo todos os 12 funcionários da instituição, nos dois turnos de trabalho.

4.2 Coleta das amostras

4.2.1 Amostragem do estudo

Para avaliar o conteúdo microbiano presente nos resíduos e nos funcionários que os manuseiam foram realizadas duas coletas, no período de fevereiro e março de 2014. No primeiro mês, foram coletadas amostras dos resíduos e dos trabalhadores e no segundo mês, apenas os funcionários foram avaliados.

Os profissionais envolvidos nesse estudo que auxiliaram no manuseio dos resíduos foram selecionados por terem recebido treinamento prévio, por estarem com o cartão de vacinação atualizado e por apresentarem competência imunológica, comprovada por sorologia contra agentes biológicos. Antes do procedimento, as normas de segurança foram repassadas a todos os componentes da equipe e durante todo o tempo de coleta os equipamentos de proteção individual foram utilizados. Todo o trabalho foi realizado com supervisão e seguindo as normas estabelecidas.

Os resíduos potencialmente infecciosos gerados durante 24 horas foram coletados e apenas aqueles considerados potencialmente infectantes (luvas, máscaras, algodões e gazes contaminadas, dentre outros que entraram em contato com secreções corpóreas de pacientes) foram selecionados. Os materiais não contaminados (papéis toalha, embalagens, envelopes, sacos plásticos, dentre outros) e os resíduos semelhantes à domiciliares (restos de comida,

jornais, canetas, escovas de dente e outros materiais) foram desprezados e alocados novamente em sacos plásticos específicos para resíduos biológicos, para seu descarte adequado.

Os resíduos potencialmente infectantes foram distribuídos sobre uma lona de plástico previamente desinfetada e seu quarteamento foi realizado com base em metodologias previamente estabelecidas (TIEW *et al.*, 2010; DAL PONT *et al.*, 2013), conforme demonstrado na Figura 5. Dois quartis opostos foram descartados e os dois restantes foram agrupados para a retirada aleatória de 500 g das amostras dos resíduos. Os materiais foram alocados em um recipiente previamente esterilizado com raios gama para a coleta do líquido lixiviado, obtido após uma hora de contato entre os resíduos e 500 mL de solução salina estéril acrescida de *Tween* 80.

Figura 5: Quarteamento dos resíduos infecciosos odontológicos gerados durante 24 horas



Foram também coletadas amostras das narinas, mãos e aventais dos 12 profissionais que manusearam os resíduos infecciosos em dois momentos diferentes, com um intervalo de um mês entre as coletas.

Para a coleta dos espécimes clínicos das fossas nasais foi utilizada a metodologia descrita por Neves (2007). Um *swab* esterilizado e umedecido em soro fisiológico foi

inserindo aproximadamente um centímetro dentro da narina do funcionário e foram feitos movimentos rotatórios, durante 10 a 15 segundos, para atingir toda a mucosa nasal. O procedimento foi realizado separadamente nas narinas direita e esquerda e, após a coleta, os espécimes clínicos foram transferidos para tubos de rosca contendo 2 mL de solução salina e foram armazenados em ambiente refrigerado.

Os micro-organismos presentes nas mãos dos profissionais foram coletados de acordo com o protocolo de Snyder *et al.* (2008). Um *swab* esterilizado e umedecido em soro fisiológico estéril foi passado nas duas mãos, iniciando sempre pela mão não-dominante do funcionário. O *swab* foi passado no dorso de cada dedo e dois círculos na palma da mão foram realizados. O mesmo procedimento de armazenamento foi realizado para essa etapa.

Para a avaliação dos aventais, um *swab* esterilizado foi umedecido em soro fisiológico estéril e foi desenhada a letra 'W' na parte anterior do tronco. O desenho se iniciou abaixo da linha mamária, passando pela região umbilical e terminando abaixo da região mamária contralateral (SNYDER *et al.*, 2008).

4.2.2 Instituições participantes

Esse estudo foi realizado em uma instituição de assistência à saúde odontológica, pública e autárquica, na cidade de Belo Horizonte, em Minas Gerais. O quadro clínico é composto de 155 profissionais de saúde (dentistas, auxiliares e técnicos) que oferecem uma média de 3.534 consultas/mês em diversas especialidades, incluindo cirurgias, odontopediatria, emergências, entre outras. (VIEIRA *et al.*, 2013).

As análises microbiológicas fenotípicas e genotípicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.2.3 Período do estudo

O estudo foi conduzido durante o período de dois anos, de janeiro de 2014 a janeiro de 2016. No primeiro ano, foram realizadas a entrevista aos funcionários, as coletas dos espécimes clínicos, a identificação morfológica/bioquímica bem como a análise fenotípica do perfil de resistência aos antimicrobianos dos micro-organismos isolados. No segundo ano, foram realizados a busca por genes de resistência aos antimicrobianos, a avaliação da similaridade clonal, o ensaio de formação de biofilme, a redação do artigo e da dissertação.

4.2.4 Aspectos éticos

A coleta dos espécimes clínicos e a entrevista aos funcionários foram realizadas em ambiente reservado, de acordo com a metodologia descrita. A participação no trabalho foi voluntária, precedida de orientações quanto à metodologia da coleta do material e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A) foi preenchido após leitura e esclarecimentos, quando necessário. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais com o Parecer Consubstanciado 006/2013 de 09 de agosto de 2013 e também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, recebendo o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – CAAE de Número 24911213.5.0000.5149.

4.3 Etapa laboratorial

4.3.1 Isolamento e armazenamento

Os espécimes clínicos coletados nos resíduos e nos profissionais foram transportados para o Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG sob refrigeração. Para o cultivo bacteriano, foi utilizado Ágar Sangue como meio enriquecido (com o Agar *Brain Heart Infusion* - BHI - como base) (**Difco™**, Sparks, USA) e os meios de ágar Manitol, MacConkey, Bile Esculina, e Cetrimida como meios seletivos (**Difco™**, Sparks, USA). O líquido lixiviado dos resíduos foi diluído até a concentração de 10^{-4} e 100 µl de cada uma das diluições foram plaqueados em cada meio de cultura pelo método *spread-plate*. Os espécimes provenientes dos funcionários sofreram diluição até a concentração de 10^{-2} apenas para o plaqueamento no meio Ágar Sangue, e 100 µl das amostras foram inoculados nos meios, também pelo método *spread-plate*. A mesma metodologia foi empregada para a detecção de leveduras nos funcionários e nos resíduos, utilizando o meio seletivo Ágar *Sabouraud* (**Difco™**, Sparks, USA), acrescido do antimicrobiano cloranfenicol (0,1g/L).

Após crescimento, as colônias foram caracterizadas de acordo com seu morfotipo, isoladas para obtenção de culturas puras e um esfregaço em lâmina foi realizado para coloração pelo método de Gram e confirmação da pureza da amostra. Confirmada a ausência de contaminantes, cada uma das amostras bacterianas foi armazenada em tubos de criopreservação contendo meio *Brucella* (**Difco™**, Sparks, USA) acrescido de 10% de

glicerol, após um crescimento em meio *Tryptic Soy Agar* - TSA (**Difco**TM, Sparks, **USA**) durante 24 horas, a 37°C. As amostras isoladas de levedura foram cultivadas em Ágar *Sabouraud* acrescido de cloranfenicol (0,1g/L) por um período 48 horas a 25°C e as mesmas foram armazenadas em meio GYMP. Em seguida, as amostras foram alocadas em um *freezer* com temperatura aproximada de -80°C, no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

4.3.2 Identificação das amostras isoladas

As amostras classificadas como Gram-negativas foram identificadas pelo sistema automatizado VITEK® 2 Compact (**Biomerieux**, Marcy I' Etoile, **France**), utilizando-se os cartões específicos para identificação de bactérias Gram-negativas (**GN Test Kit VTK 2; Biomerieux**, Marcy I' Etoile, **France**).

As amostras classificadas como cocos Gram-positivas passaram por uma triagem de provas bioquímicas objetivando a identificação presuntiva da espécie *Staphylococcus aureus*. Inicialmente, os micro-organismos foram cultivados em ágar Manitol e aqueles que fermentaram o carboidrato foram submetidos aos testes da catalase (**Perhidrol**, 30%; **Merck**, Darmstadt, **Alemanha**), coagulase (**Coagu-Plasma LB; Laborclin**, Pinhais, **Brasil**) e DNase (**Sigma-Aldrich**, St. Louis, **EUA**). As amostras coletadas também foram cultivadas em ágar Bile Esculina para a triagem de *Enterococcus faecium*. Após o resultado, todas as amostras que obtiveram resultado positivo para os quatro testes de *S. aureus* e para a Bile Esculina tiveram a sua identificação comprovada pelo sistema automatizado VITEK® 2 Compact, utilizando-se os cartões específicos para identificação de bactérias Gram-positivas (**GP Test Kit VTK 2; Biomerieux**, Marcy I' Etoile, **France**).

As amostras de leveduras foram também identificadas pelo sistema automatizado VITEK® 2 Compact utilizando-se os cartões específicos para identificação de leveduras (**YST Test Kit VTK 2; Biomerieux**, Marcy I' Etoile, **France**) e serão utilizadas em estudos posteriores.

Para preparação do inóculo, as amostras Gram-positivas e Gram-negativas foram cultivadas em meio TSA, durante 24 horas a 37°C. A metodologia utilizada seguiu as recomendações do fabricante, iniciando com a diluição da colônia em 3 mL de solução salina estéril (0,9%) até uma densidade ótica - DO de 0,50 a 0,63. As leveduras foram cultivadas em meio *Sabouraud*, acrescido de cloranfenicol (0,1g/L), durante 48 horas a 25°C e a amostra foi diluída até uma DO entre 1,8 e 2,2. O cartão específico para cada micro-organismo foi

acoplado ao tubo contendo a diluição requisitada e ambos foram introduzidos no equipamento Vitek® 2. Após a absorção da amostra pelo cartão, o mesmo foi encaixado ao carrossel do aparelho para a identificação das espécies.

4.3.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

As amostras bacterianas selecionadas para o estudo tiveram seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos avaliado por meio do sistema automatizado VITEK® 2 Compact. Para os Gram-negativos, foi utilizado o cartão AST-N239 (Biomérieux®) contendo os seguintes antimicrobianos: amicacina, gentamicina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefepima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacino, colistina, ertapenem, imipenem, meropenem, piperaciclina/tazobactam, tigeciclina e teste para ESBL (confirmatório). Para os gram-positivos, foi utilizado o cartão AST-P585 (Biomérieux®) contendo os seguintes antimicrobianos: ampicilina, benzilpenicilina, oxacilina, screening para cefoxitina, gentamicina, ciprofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, clindamicina, eritromicina, linezolida, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, ácido fusídico, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol.

Para preparação do inóculo, as amostras Gram-positivas e Gram-negativas foram cultivadas em meio TSA durante 24 horas a 37°C. A diluição da colônia foi feita em 3 mL de solução salina estéril (0,9%) até a DO estabelecida pelo fabricante de 0,50 a 0,63. Para as amostras Gram-negativas, 145 µL foram retirados da diluição inicial e foram novamente diluídos em 3 mL de solução salina. Para as amostras Gram-positivas, o mesmo procedimento foi realizado, porém com um volume de 280 µL para nova diluição em salina. O cartão de antibiograma específico para cada bactéria foi acoplado ao tubo contendo a diluição e ambos foram introduzidos ao equipamento Vitek® 2. Após a absorção da amostra pelo cartão, o mesmo foi encaixado ao carrossel do aparelho para a realização do antibiograma das espécies.

4.3.4 Detecção genotípica de β-lactamases

Foram pesquisados, por meio de reação em cadeia da polimerase, os seguintes genes codificadores de β-lactamases, considerando sua relevância e prevalência em amostras clínicas: *bla_Z*, *mecA*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SPM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*.

a) Extração do DNA bacteriano

Para extração do DNA bacteriano de amostras Gram-negativas, foi utilizado o protocolo do Kit Wizard® *Genomic DNA Purification* (**Promega®**, Madison, USA).

As amostras foram cultivadas em 5 mL de *Tryptic Soy Broth* – TSB – durante 24 horas, a 37°C. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e 600 µL de solução de lise nuclear foi pipetada gentilmente até ressuspender o *pellet*, permanecendo assim por 5 minutos a uma temperatura de 80°C. Após esfriar até a temperatura ambiente, foi adicionado 3 µL de RNase e a solução foi novamente incubada a 37°C por 15 a 60 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução precipitadora de proteína, homogeneizado e incubado no gelo durante 5 minutos seguidos de centrifugação a 14.000 rpm durante 3 minutos.

Para precipitação e reidratação do DNA, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 600µL de isopropanol armazenado em temperatura ambiente, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. Após esse procedimento, 600 µL de etanol 70% também armazenado a temperatura ambiente foram adicionados e a amostra foi homogeneizada e centrifugada conforme descrito acima, por 2 minutos. O etanol foi então aspirado e após a secagem do *pellet* o DNA foi reidratado com 50 µL de solução reidratante e permaneceu a 65°C por 1 hora.

Para a extração do DNA bacteriano de Gram-positivas, foi utilizado o protocolo de Martins *et al* (2014), com modificações.

As amostras foram cultivadas em agar TSA a 37°C por 24 horas. Em seguida, colônias foram inseridas em 200µL de PBS 1% e centrifugadas a 6500 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Após descarte do sobrenadante, 200µL foram acrescentados ao *pellet* e a amostra foi colocada por 10 minutos em banho-maria a 100°C. Após esse procedimento, a amostra foi centrifugada a 6500 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo novo.

A concentração de DNA foi quantificada pelo aparelho Nanodrop®. Para a comprovação da presença e integridade do DNA, o mesmo foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,0% com Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE). A corrida foi de aproximadamente 30 minutos, a 88 volts. O gel foi submerso em tampão de coloração (**Sybr® Safe DNA gel stain; Life Technologies, NY, USA**) sob agitação durante 30 minutos e as imagens foram capturadas em um transiluminador.

b) Preparo do Master Mix

Para a amplificação dos genes estudados, foi utilizado o kit Master Mix (**Phoneutria**[®], Belo Horizonte, **Brasil**) contendo: Taq DNA polimerase, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e cloreto de magnésio - MgCl₂. A concentração de DNA nas amostras de *S. aureus* foi de 50 ng/μL, nas amostras Gram-negativas de 30 ng/μL e os *primers* se encontravam a uma concentração de 10 mM/μL.

Para avaliar a presença do gene *blaZ*, foram utilizados 12,5 μL de Master Mix, 2 μL de cada um dos *primers forward* e *reverse*, 6,5 μL de água livre de nucleases e 2 μL de DNA. Para o gene *mecA* foram utilizados 12,5 μL de Master Mix Promega[®], 1,5 μL de cada um dos *primers*, 7,5 μL de água livre de nucleases e 2 μL de DNA. Para detecção dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, foram utilizados 12,5 μL de Master Mix acrescido de 1,0 μL de cada *primer*, 1,0 μL de DNA bacteriano e 9,5 μL de água livre de nuclease para completar o volume final de 25 μL. Para o gene *bla_{CTX-M}*, o volume de cada *primer* utilizado foi de 1,2 μL, acrescido de 12,5 μL de Master Mix, 9,1 μL de água e 1 μL de DNA. Para detecção das MβLs *bla_{SPM}*, *bla_{IMP}*, foi utilizado 12,5 μL de Master Mix acrescido de 1,5 μL de cada *primer*, 1,0 μL de DNA bacteriano e 8,5 μL de água livre de nuclease. Para os genes *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, foram utilizados 12,5 μL de Master Mix, 1,0 μL de cada um dos *primers*, 1,2 μL de DNA e 9,3 μL de água livre de nuclease.

c) Condições de amplificação

As condições de amplificação dos genes *mecA*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SPM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{GIM}*, bem como os iniciadores utilizados e o tamanho dos amplicons estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2: Oligonucleotídeos, amplicons e condições de reação de PCR utilizados na pesquisa de genes de resistência à antimicrobianos.

Genes	Fenótipo de Resistência	Sequência dos <i>primers</i>	Condições de amplificação	Amplicon	Referência
<i>bla_Z</i>	Penicilinase	ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 30s; 55°C, 30s; 72°C, 30s, Extensão final: 72°C, 4 min	173 pb	Matineau <i>et al.</i> , 2000 com modificações
<i>mecA</i>	Oxacilinase	TCC AGG AAT GCA GAA AGA CCA AAG C GAC ACG ATA GCC ATC TTC ATG TTG G	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 36x: 94°C, 1min e 30 s; 52,3°C, 1min; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 10 min	499 pb	Al-Charrakh; Obayes, 2014 com modificações
<i>bla_{SHV}</i>	ESBL	CTT TAC TCG CCT TTA TCG GC TTA CCG ACC GGC ATC TTT CC	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 56°C, 1min; 72°C, 1min; 94°C, 1min, 45°C, 1min. Extensão final: 72°C, 1 min	982 pb	Jones <i>et al.</i> , 2009
<i>bla_{TEM}</i>	ESBL	GTC CGC GGA ACC CCT ATT TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 56°C, 1min; 72°C, 1min; 94°C, 1min, 45°C, 1min. Extensão final: 72°C, 5 min	968 pb	Jones <i>et al.</i> , 2009
<i>bla_{CTX-M}</i>	ESBL	CGC TTT GCG ATG TGC AG ACC GCG ATA TCG TTG GT	35x: 94°C, 30s; 60°C, 1min; 72°C, 1min; Extensão final: 72°C, 1 min	551 pb	Paterson <i>et al.</i> , 2003
<i>bla_{SPM}</i>	Carbapenemases	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	Desnaturação inicial 94°C, 1 min, 30x: 94°C, 1min; 54°C, 1min; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 6 min	271 pb	Findlay <i>et al.</i> , 2012
<i>bla_{IMP}</i>	Carbapenemases	CCA AAC YAC TAS GTT ATC T GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C	Desnaturação inicial 94°C, 1 min, 30x: 94°C, 1min; 54°C, 1min; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 6 min	189 pb	Findlay <i>et al.</i> , 2012
<i>bla_{VIM}</i>	Carbapenemases	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	Desnaturação inicial 94°C, 1 min, 30x: 94°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 6 min	390 pb	Findlay <i>et al.</i> , 2012
<i>bla_{GIM}</i>	Carbapenemases	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	Desnaturação inicial 94°C, 1 min, 30x: 94°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 6 min	477 pb	Findlay <i>et al.</i> , 2012

d) Eletroforese

Alíquotas dos produtos obtidos pela PCR foram acrescentados a uma solução contendo tampão de amostra e GelRed™. Os amplicons foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose (**Sigma-Aldrich**, St. Louis, **EUA**) submersos em tampão TBE. Para as bandas com o tamanho de 173 pb, 189 pb, 271 pb, 390 pb foi utilizada uma concentração de 1,2% de agarose e para aquelas com tamanho de 477 pb, 499 pb, 551 pb, 968 pb e 982 a concentração foi de 1,0%. Após a corrida, as imagens foram capturadas sob luz ultravioleta em um transiluminador (**Kasvi**, Curitiba, **Brasil**).

e) Controle de qualidade

Foi utilizado, em todas as eletroforeses, o marcador de 100 pb DNA *ladder* (**Promega®**, Madison, **USA**) para a determinação precisa do tamanho do produto amplificado. Controles positivos para os genes pesquisados e controles negativos também foram utilizados em todas as reações.

4.3.5 Sequenciamento do gene de interesse

Após amplificação do gene de interesse, este foi purificado de acordo com o Protocolo de Precipitação com Polietilenoglicol (PEG). Inicialmente, 15 µL de uma solução de PEG 20% (p/v) acrescida de NaCl 2,5M foram adicionados a um eppendorf, juntamente com 15 µL do produto de DNA amplificado (1:1). Após homogeneização da amostra, a mesma foi incubada em banho-maria a 37°C durante 1 hora e, em seguida, foi centrifugada a 13.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e foram acrescentados 125 µL de álcool etílico 80% gelado, seguindo de nova centrifugação a 13.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, seguido de novo acréscimo de álcool etílico 80% gelado e centrifugação sob as mesmas condições descritas acima. Após descarte do sobrenadante, o eppendorf permaneceu na estufa a 37°C para secagem e o DNA foi ressuspensionado em 15 µL de água Mili-Q e quantificado no Nanodrop®.

A reação de sequenciamento foi realizada em um volume final de 7,5 µL, contendo uma quantidade de DNA variando entre 20 a 30 ng para cada 100 pb da amostra a ser sequenciada, 1 µL de cada um dos iniciadores descritos no Quadro 2 (10 pmol) e água Mili-Q o suficiente para completar o volume final.

A amostra foi sequenciada por eletroforese capilar em aparelho ABI3130 pela empresa MYLEUS Biotechnology®. A sequência foi editada no programa BioEdit Sequence Alignment (HALL, 1999) e comparada com o banco de dados disponível no NCBI, por meio do programa BLAST.

4.3.6 Caracterização do perfil de similaridade clonal das amostras

Para a análise de similaridade entre as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* encontradas, foi utilizada a reação em cadeia da polimerase com iniciador arbitrário (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD).

a) Extração do DNA bacteriano e preparo do Master Mix

A extração do DNA das amostras bacterianas foi realizada de acordo com o protocolo do kit Wizard® Genomic DNA Purification, conforme descrito no item 4.3.4a. Os *primers* utilizados foram o CagA2 (5` ATT TAG AAG CAG GCT TTA GC 3`) e o CMVin2 (5`GGT AGC ACG CGG GTT TCG AC 3`). Para essa reação, foram utilizados 12,5 µl de Master Mix acrescidos de 1,0 µL de cada *primer* (10 mM), 1,0 µL de DNA bacteriano em uma concentração de 30 ng/µL e 9,5 µL de água livre de nuclease, para completar o volume final de 25 µl.

b) Condições de amplificação

As condições de amplificação foram realizadas de acordo com Dabrowski *et al.*, 2003, conforme se segue abaixo:

- 94°C por 2 minutos;
- 5 ciclos de desnaturação a 94°C, por 30 segundos, anelamento a 30°C por 5 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de:
- 25 ciclos de desnaturação a 94°C, por 30 segundos, anelamento a 30°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto.
- Extensão final 72°C por 7 minutos.

c) Eletroforese

Os produtos obtidos pela PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose (**Sigma-Aldrich**, St. Louis, EUA) a 2%, submersos em tampão TBE. A

corrida foi realizada durante aproximadamente 120 minutos, a 70V. As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio, sobre luz ultravioleta.

d) Interpretação dos resultados

Uma matriz binária foi construída considerando a presença (1) ou a ausência (0) de fragmentos de DNA amplificados e a mesma foi inserida no programa Past software 3.0 para a confecção do dendograma por meio do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method algorithm*). O coeficiente de Sorensen-Dice foi utilizado para a determinação do grau de similaridade. Os perfis que apresentaram similaridade acima de 85% foram considerados geneticamente relacionados.

4.3.7 Ensaios de formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*

*4.3.7.1 Produção de Substância Polimérica Extracelular por amostras de *P. aeruginosa**

A produção de substância polimérica extracelular por amostras de *P. aeruginosa* foi avaliada por meio do teste do Ágar Vermelho Congo, baseado no protocolo de Rewatkar e Wadher (2013). Para a preparação do meio, foi utilizado o Agar BHI (40 g/L) e o corante Vermelho Congo (8 g/L). Os micro-organismos foram inoculados na placa e incubados a 37°C durante 24 horas, em um ensaio em duplicata. Após esse período, a presença de colônias pretas indicou a produção de EPS e a presença de colônias vermelhas, a ausência de produção da substância.

*4.3.7.2 Avaliação da hipervirulência (hipermucosividade) da amostra de *K. pneumoniae**

Para avaliar a hipervirulência da amostra de *K. pneumoniae* isolada, foi realizado o *string test* ou teste do fio. O inóculo bacteriano foi realizado em TSA e a placa permaneceu incubada por 24 horas a 37°C. Para que o teste seja positivo, a colônia deve ser tocada por uma alça bacteriana e gerar um fio viscoso contendo um comprimento de no mínimo 5 mm, conforme demonstrado na Figura 9B, item 5.6.2.

*4.3.7.3 Ensaio de aderência de biofilme por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em microplacas de poliestireno*

Para a avaliação da formação de biofilme em amostras de *P. aeruginosa* foi utilizado o protocolo de Perez *et al.*, (2011) com modificações. Para esse ensaio, foram

utilizadas placas de poliestireno contendo 96 poços com fundo plano. As amostras selecionadas foram semeadas em meio TSA, utilizando a técnica de esgotamento, e foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Três colônias foram então repicadas para tubos contendo 3 mL de TSB (**Himedia®**, Mumbai, **India**) e os mesmos foram novamente incubados por 24 horas a 37°C. Após esse período, a cultura foi homogeneizada e diluída na proporção 1:100 em um novo tubo contendo TSB. Em seguida, foram aplicados 200 µL da diluição nos poços, em quadruplicata, e as placas foram incubadas durante quatro horas, a 25°C e a 37°C, para a avaliação da produção rápida de biofilme e também durante 24 e 48 horas, sob as mesmas condições de temperatura. Foram realizados para todos os ensaios controles negativos contendo apenas o caldo TSB, sem a alíquota bacteriana diluída. Após o período de incubação, o conteúdo das placas foi aspirado e os poços foram lavados três vezes com 200 µL de Tampão fosfato-salino - PBS. A placa permaneceu em temperatura ambiente para a secagem completa dos poços e posteriormente foram inseridos 200 µL de metanol (99%) para a fixação do biofilme. Após 15 minutos, os poços foram esvaziados e deixados novamente em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, 200 µL de cristal violeta (1%) (**NewProv**, Pinhais, **Brasil**) foram adicionados aos poços por 15 minutos. Após a coloração do biofilme, o corante foi aspirado, os poços lavados três vezes com 200 µL de PBS e a placa permaneceu em temperatura ambiente para a secagem. Após esse procedimento, o corante fixado no biofilme foi eluído com 200 µL de etanol (99,5%) durante 10 minutos e então o conteúdo foi aspirado e transferido para outra placa estéril.

O conteúdo aspirado foi quantificado por meio de um leitor de ELISA (**Thermo Scientific**, **EUA**) em um comprimento de onda de 570 nm e os resultados foram apresentados de acordo com a classificação de aderência proposta por Stepanović *et. al* (2000). De acordo com os autores, os micro-organismos são classificados conforme os valores médios de densidade ótica (DO) quando comparado com a DO do controle negativo (DOc). Dessa forma, temos as seguintes categorias: não aderente, quando a média da DO \leq média DOc; fracamente aderente quando a média do DOc $<$ média DO \leq 2x média DOc; moderadamente aderente, quando 2x média DOc $<$ média DO \leq 4x média DOc ou fortemente aderente, quando 4x média DOc $<$ média DO.

5 RESULTADOS

5.1 Questionário

5.1.1 Dados pessoais e profissionais

O questionário abordando questões relativas às normas de Biossegurança foi elaborado por Oliveira (2013) e aplicado, com modificações, aos 12 trabalhadores responsáveis pela limpeza/desinfecção dos departamentos clínicos e administrativos e também pela coleta, transporte e manuseio dos resíduos odontológicos. As informações pessoais e profissionais da equipe podem ser encontradas na Tabela 1. Todos os funcionários possuíam uma carga horária semanal de trabalho de 44 horas e a equipe trabalhava em dois turnos diferentes: seis profissionais iniciavam a jornada às 06:00 horas e o restante às 13:00 horas.

Tabela 1: Dados pessoais e profissionais dos funcionários da Instituição

Variáveis		n	%
Idade (anos)	30-40	2	16,7
	41-50	7	58,3
	51-60	3	25,0
Gênero	Feminino	11	91,7
	Masculino	1	8,3
Tempo de profissão (meses)	<24	3	25,0
	24-36	4	33,3
	37-120	2	16,7
	>120	3	25,0
Grau de escolaridade	Ensino Fundamental Incompleto	8	66,6
	Ensino Médio Incompleto	2	16,7
	Ensino Médio Completo	2	16,7

Legenda: n: tamanho da amostra.

5.1.2 Informações sobre os resíduos

Todos os funcionários estavam cientes das cores dos sacos preconizados para o acondicionamento dos resíduos infectantes (cor branca) e dos resíduos comuns (cor

azul) e informaram que essa prática é adotada na Instituição. Quando questionados se acreditavam na existência de micro-organismos nos resíduos manipulados por eles e na possibilidade de transmissão de doenças, todos responderam positivamente. A Tabela 2 mostra as respostas dos trabalhadores sobre o conhecimento a respeito dos micro-organismos e as doenças que podem ser transmitidas na prática laboral.

Tabela 2: Micro-organismos, doenças e materiais biológicos que podem ser encontrados nos resíduos e podem estar envolvidos em processos infecciosos

Micro-organismos	n	%
Bactéria	4	33,6
HIV	1	8,3
HIV e bactéria	1	8,3
HIV e hepatite	1	8,3
HIV, vírus, gripe e secreção	1	8,3
HIV, hepatite, micose, tuberculose e secreção	1	8,3
HIV, bactéria, fungos, hepatite	1	8,3
Fungos	1	8,3
Secreção	1	8,3
Total	12	100

Legenda: HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*; n: tamanho da amostra.

Posteriormente, foi perguntado aos profissionais há quanto tempo o último treinamento de capacitação sobre normas e rotinas de biossegurança foi realizado. Dez funcionários (83,4%) realizaram o curso há menos de seis meses da data da pesquisa, um deles (8,3%) realizou entre 12 e 24 meses atrás e um (8,3%) não soube responder.

5.1.3 Equipamentos de Proteção Individual e Vacinação

Todos os funcionários utilizam os seguintes EPIs durante a jornada de trabalho: luvas de borracha, gorro, máscara, óculos, sapatos fechados ou botas e uniforme em brim reforçado, com calça. Durante a manipulação dos resíduos, 11 profissionais (91,7%) relataram que não recebem gotículas ou respingos em nenhuma parte do corpo

e apenas um (8,3%) não soube responder se já foi contaminado realizando essa atividade. Quando questionados sobre a lavagem das mãos todos responderam que realizam a higiene antes e após cada procedimento de limpeza, antes e após uso dos toaletes e antes das refeições.

Em relação aos acidentes ocupacionais, apenas um funcionário relatou acidente com materiais pontiagudos durante a jornada de trabalho, sendo ferido na ponta dos dedos, enquanto os outros 11 nunca se feriram enquanto manuseavam os resíduos da instituição. Após o acidente, o profissional comunicou ao gerente responsável e seguiu o protocolo institucional. A equipe citou falta de atenção (83,3%) e descarte errado dos resíduos por outros profissionais como as principais causas de acidentes durante as atividades laborais. No caso de um ferimento hipotético, 91,7% da equipe lavaria o local afetado com água e sabão e comunicaria o acidente ao responsável, enquanto um membro realizaria apenas a última conduta citada.

A vacinação contra Hepatite B e Tétano foi efetivada em todos os profissionais, entretanto apenas 16,7% confirmaram a imunização contra hepatite pelo teste Anti-HBS, 50% não realizou esse procedimento e 33,3% da equipe não sabia se tinha ou não realizado o teste.

5.2 Isolamento e identificação microbiológica

Durante o processo de separação manual dos resíduos, foi encontrado um objeto perfurocortante, conforme demonstrado na Figura 6, descartado de maneira incorreta nos sacos plásticos brancos destinados a receber apenas os resíduos potencialmente infectantes.

Figura 6 – Material perfurocortante descartado incorretamente junto aos resíduos potencialmente infectantes



Após 24 horas de trabalho, em um serviço de atenção à Odontologia, os profissionais geraram 18,2 kg de resíduos potencialmente infectantes, que foram coletados para a avaliação microbiológica.

Foram isolados 373 morfotipos de micro-organismos nos 12 funcionários e no líquido lixiviado a partir dos resíduos, em ambas as coletas realizadas nesse estudo. Dentre eles, 320 foram identificados como cocos Gram-positivos, 30 como bastonetes Gram-negativos, 11 como bastonetes Gram-positivos e 12 como leveduras.

A Tabela 3 mostra os micro-organismos recuperados nos resíduos e nos sítios dos funcionários em ambas as coletas, separados por morfotipos e de acordo com a coloração de Gram. Conforme demonstrado, a quantidade de morfotipos isolada foi similar para todos os sítios avaliados em ambas as coletas, sendo menos prevalente nos aventais dos trabalhadores.

Tabela 3: Morfotipos isolados nos funcionários e nos resíduos potencialmente infectantes.

Funcionários									
	1ª coleta				2ª coleta				Total
	Mão	Avental	FND	FNE	Mão	Avental	FND	FNE	
CGP	48	21	48	39	42	23	52	47	320
BGN	1	1	0	5	3	0	1	3	14
BGP	0	0	4	4	1	1	1	0	11
LEV	2	1	0	0	5	1	1	1	11
Total	52	23	52	48	51	25	54	51	356
Resíduos									
BGN					16				
LEV					1				

Legenda: FND: Fossa nasal direita; FNE: Fossa nasal esquerda; CGP: Cocos Gram-positivos; BGN: Bastonetes Gram-negativos; BGP: Bastonetes Gram-positivos; LEV: Levedura.

5.2.1 Identificação de amostras bacterianas

Com o objetivo de selecionar amostras de micro-organismos clinicamente relevantes, todas as 320 bactérias Gram-positivas isoladas foram submetidas a uma triagem com os testes de catalase, coagulase e DNase, objetivando identificar amostras de *S. aureus* e foram cultivadas em agar Bile Esculina, na tentativa de selecionar a

espécie *E. faecium*. Após a triagem, as 12 amostras que obtiveram resultado positivo para todos os três testes realizados para *S. aureus* tiveram sua identificação confirmada pelo sistema automatizado Vitek® 2. Nenhuma bactéria teve o teste positivo para Bile Esculina. Todas as bactérias Gram-negativas foram identificadas diretamente no sistema Vitek® 2. Foram isoladas 30 bactérias Gram-negativas e, dentre elas, 16 foram selecionadas devido à sua relevância clínica. Ao todo, 28 amostras bacterianas foram escolhidas para esse estudo. As espécies, bem como o seu local de isolamento e a identificação do funcionário foram descritas no Quadro 3.

Quadro 3 – Amostras bacterianas isoladas de funcionários e de resíduos infectantes em fevereiro e março de 2014

FUNCIONÁRIOS							
1ª coleta				2ª coleta			
ID	Amostra	Local	ID Funcionário	ID	Amostra	Local	ID Funcionário
1T	<i>E. coli</i>	FNE	07	24T	<i>E. coli</i>	FNE	07
2T	<i>E. coli</i>	FNE	07	25T	<i>E. coli</i>	FNE	07
23T	<i>E. coli</i>	FNE	07	4T	<i>P. aeruginosa</i>	Mãos	07
12T	<i>S. aureus</i>	FND	07	6T	<i>K. pneumoniae</i>	Mãos	07
13T	<i>S. aureus</i>	FND	08	18T	<i>S. aureus</i>	FND	08
14T	<i>S. aureus</i>	FND	08	19T	<i>S. aureus</i>	FND	08
15T	<i>S. aureus</i>	FND	08	20T	<i>S. aureus</i>	FND	08
16T	<i>S. aureus</i>	FNE	08	21T	<i>S. aureus</i>	FNE	08
17T	<i>S. aureus</i>	FNE	08	22T	<i>S. aureus</i>	FNE	08
				28T	<i>S. aureus</i>	FND	11

RESÍDUOS		
ID	Amostra	Quantidade
5T a 11T	<i>P. aeruginosa</i>	7 amostras
26T e 27T	<i>Acinetobacter junii</i>	2 amostras

Legenda: ID: Identificação das amostras e dos funcionários; FND: Fossa Nasal Direita; FNE: Fossa Nasal Esquerda.

Dentre as amostras bacterianas clinicamente relevantes isoladas nos funcionários, 89,4% delas estavam presentes nas fossas nasais direita ou esquerda, 10,6% foram coletadas nas mãos e nenhuma foi isolada dos aventais dos trabalhadores. Apenas a espécie de *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada tanto nas mãos de um funcionário, quanto nos resíduos e essa foi a amostra bacteriana mais prevalente (28,5%) neste estudo.

5.2.2 Identificação de leveduras

Doze leveduras foram isoladas nos funcionários e nos resíduos potencialmente infectantes e foram identificadas pelo sistema automatizado Vitek® 2. Todas as amostras pertenciam ao gênero *Candida*, conforme demonstrado no Quadro 4.

Quadro 4: Leveduras isoladas de funcionários e de resíduos potencialmente infectantes

FUNCIONÁRIOS					
Amostra	1ª coleta		2ª coleta		
	Local	Funcionário	Amostra	Local	Funcionário
<i>C. haemulonii</i>	Mãos	04	<i>C. famata</i>	Mãos	01
<i>C. parapsilosis</i>	Avental	08	<i>C. guilliermondii</i>	Mãos	04
<i>C. parapsilosis</i>	Mãos	10	<i>C. haemulonii</i>	Mãos	06
			<i>C. haemulonii</i>	Avental	06
			<i>C. haemulonii</i>	Fossa	06
			<i>C. haemulonii</i>	Nasal D	06
			<i>C. haemulonii</i>	Fossa	06
			<i>C. haemulonii</i>	Nasal E	06
			<i>C. haemulonii</i>	Mãos	11
			<i>C. guilliermondii</i>	Mãos	12
RESÍDUOS					
Amostra			Quantidade		
<i>Candida albicans</i>			1 amostra		

As leveduras presentes nos funcionários foram predominantemente isoladas nas mãos, onde se encontravam 58,3% das amostras. A espécie *Candida haemulonii* foi a mais prevalente, representando 50% das amostras isoladas nesse estudo.

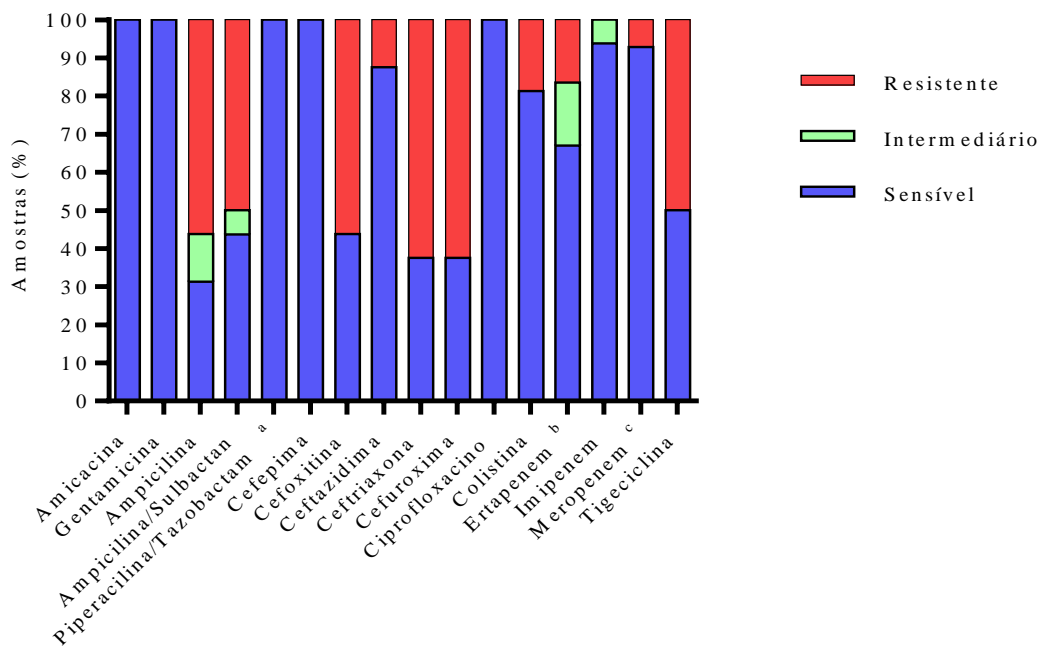
5.3 Perfil de susceptibilidade bacteriana à antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras Gram-negativas isoladas está representado no Gráfico 1. É possível observar que mais de 60% das amostras foram resistentes à Ceftriaxona e à Cefuroxima e mais da metade delas apresentaram resistência à Ampicilina e Cefoxitina. Todas as amostras desse estudo apresentaram-se sensíveis aos aminoglicosídeos e à fluoroquinolona testados, bem como ao antimicrobiano Cefepima.

No Gráfico 2 está representado o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das 12 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas das fossas nasais dos funcionários. Conforme demonstrado, todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos testados, exceto à Benzilpenicilina, a qual foi ineficaz contra 100% dos micro-organismos.

As Tabelas 4 e 5 expõe individualmente a concentração inibitória mínima, bem como o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de todos os micro-organismos selecionados para esse estudo. Das 16 amostras Gram-negativas testadas, 25% delas, incluindo três amostras de *E. coli* e uma amostra de *A. junii*, foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. De acordo com a classificação de resistência estabelecida por Magiorakos *et al.* (2012), todas as amostras de *P. aeruginosa* e duas amostras de *E. coli*, representando 62,5% das amostras Gram-negativas isoladas, foram classificadas como micro-organismos multidroga-resistentes (MDR).

Gráfico 1: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras Gram-negativas isoladas de funcionários e dos resíduos



Legenda: ^a: Apenas amostras de *K. pneumoniae* e *A. junii* foram testadas; ^b Apenas amostras de enterobactérias foram testadas; ^c: Amostras do gênero *Acinetobacter* não foram testadas.

Gráfico 2: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de funcionários

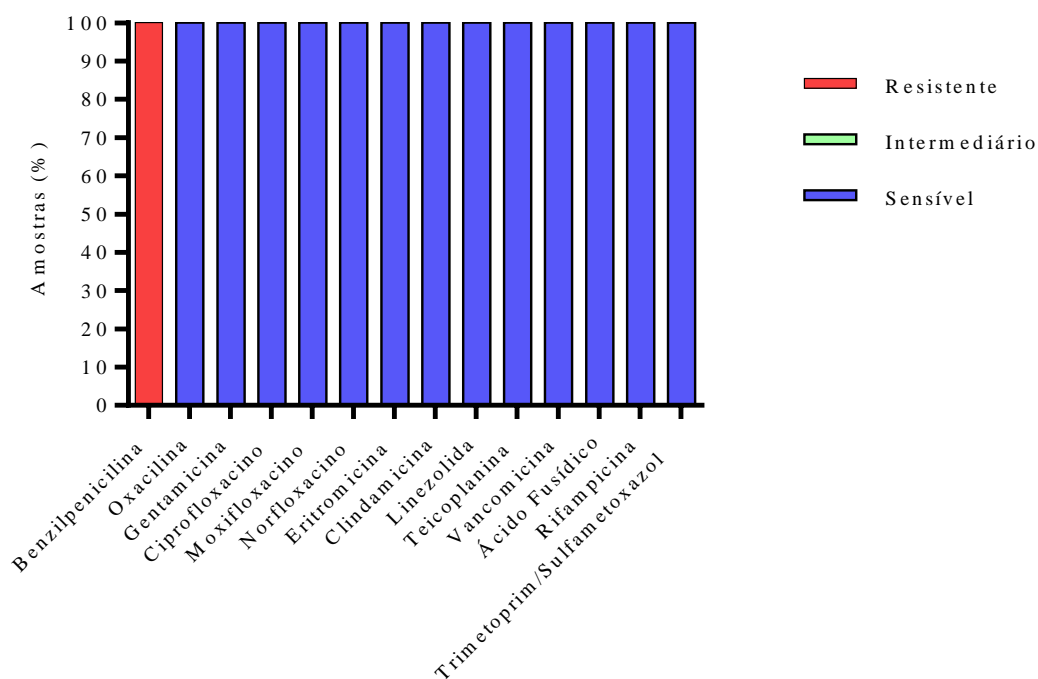


Tabela 4: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e concentrações inibitórias mínimas nos isolados Gram-negativos.

ANTIMICROBIANOS																	
Identificação	Micro-organismo	AMI		GEN		AMP		SBA		PPT		CPM		CTX		CAZ	
		CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.
1T	<i>E. coli</i>	4	S	2	S	16	I	8	S	NA	NA	≤ 1	S	8	R	8	R
23T	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 2	S	≤ 2	S	NA	NA	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 1	S
2T	<i>E. coli</i>	8	S	4	S	16	I	16	I	NA	NA	≤ 1	S	8	S	16	R
24T	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 2	S	≤ 2	S	NA	NA	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 1	S
25T	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 2	S	≤ 2	S	NA	NA	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 1	S
3T	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	16	R	4	S	NA	NA	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 1	S
4T	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≥ 32	R	≥ 32	R	NA	NA	≤ 1	S	≥ 64	R	≤ 1	S
5T	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≥ 32	R	≥ 32	R	NA	NA	≤ 1	S	≥ 64	R	≤ 1	S
6T	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≥ 32	R	≥ 32	R	NA	NA	≤ 1	S	≥ 64	R	≤ 1	S
7T	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≥ 32	R	≥ 32	R	NA	NA	≤ 1	S	≥ 64	R	≤ 1	S
8T	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≥ 32	R	≥ 32	R	NA	NA	≤ 1	S	≥ 64	R	≤ 1	S
9T	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≥ 32	R	≥ 32	R	NA	NA	≤ 1	S	≥ 64	R	≤ 1	S
10T	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≥ 32	R	≥ 32	R	NA	NA	≤ 1	S	≥ 64	R	≤ 1	S
11T	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≥ 32	R	≥ 32	R	NA	NA	≤ 1	S	≥ 64	R	≤ 1	S
26T	<i>A. junii</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 2	S	≤ 2	S	≤ 4	S	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 1	S
27T	<i>A. junii</i>	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 2	S	≤ 2	S	≤ 4	S	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 1	S

Legenda: AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; AMP: Ampicilina; SBA: Ampicilina/Sulbactan; PPT: Piperacilina/Tazobactan; CPM: Cefepime; CTX: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima; CIM: Concentração Inibitória Mínima; Fenót: Fenótipo; S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente. NA: Não avaliado.

Tabela 4: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e concentrações inibitórias mínimas nos isolados Gram-negativos (continuação).

ANTIMICROBIANOS																	
Identificação	Micro-organismo	CRO		CXM		CIP		CL		ETP		IMI		MER		TGC	
		CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.
1T	<i>E. coli</i>	4	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	4	R	1	I	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
23T	<i>E. coli</i>	≤ 1	S	4	S	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ ,25	S	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S
2T	<i>E. coli</i>	8	R	≥ 64	R	0,5	S	8	R	2	R	2	I	4	R	≤ 0,5	S
24T	<i>E. coli</i>	≤ 1	S	4	S	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S
25T	<i>E. coli</i>	≤ 1	S	4	S	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S
3T	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 1	S	2	S	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S	1	S
4T	<i>P. aeruginosa</i>	8	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S	NA	NA	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S	4	R
5T	<i>P. aeruginosa</i>	16	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	≤ 0,5	S	NA	NA	2	S	≤ 0,25	S	≥ 8	R
6T	<i>P. aeruginosa</i>	8	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	1	S	NA	NA	2	S	≤ 0,25	S	≥ 8	R
7T	<i>P. aeruginosa</i>	8	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	0,5	S	NA	NA	2	S	≤ 0,25	S	≥ 8	R
8T	<i>P. aeruginosa</i>	8	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	0,5	S	NA	NA	2	S	≤ 0,25	S	≥ 8	R
9T	<i>P. aeruginosa</i>	8	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	0,5	S	NA	NA	2	S	≤ 0,25	S	≥ 8	R
10T	<i>P. aeruginosa</i>	16	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	0,5	S	NA	NA	2	S	≤ 0,25	S	≥ 8	R
11T	<i>P. aeruginosa</i>	8	R	≥ 64	R	≤ 0,25	S	1	S	NA	NA	2	S	≤ 0,25	S	≥ 8	R
26T	<i>A. junii</i>	4	S	2	S	≤ 0,25	S	4	R	NA	NA	≤ 0,25	S	NA	NA	≤ 0,5	S
27T	<i>A. junii</i>	4	S	2	S	≤ 0,25	S	2	S	NA	NA	≤ 0,25	S	NA	NA	≤ 0,5	S

Legenda: CRO: Ceftriaxona; CXM: Cefuroxima; CIP: Ciprofloxacino; CL: Colistina; ETP: Ertapenem; IMI: Imipenem; MER: Meropenem; TGC: Tigeciclina; CIM: Concentração Inibitória Mínima; Fenót: Fenótipo; S: Sensível; I: intermediário; R: Resistente. NA: Não avaliado.

Tabela 5: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e concentrações inibitórias mínimas nos isolados Gram-positivos.

ANTIMICROBIANOS																	
Identificação	Micro-organismo	BZP		OXA		GEN		CIP		MXF		NOR		ERY		CLI	
		CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.
12T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
13T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
14T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
15T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
16T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
17T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
18T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
19T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
20T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
21T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
22T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,25	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
28T	<i>S. aureus</i>	≥ 0,5	R	0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,25	S	0,5	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S

Legenda: BZP: Benzilpenicilina; OXA: Oxacilina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacino; MXF: Moxifloxacino; NOR: Norfloxacino; ERY: Eritromicina; CLI: Clindamicina; CIM: Concentração Inibitória Mínima; Fenót: Fenótipo; S: Sensível; R: Resistente.

Tabela 5: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e concentrações inibitórias mínimas nos isolados Gram-positivos (continuação).

ANTIMICROBIANOS															
Identificação	Micro-organismo	LNZ		TEC		VAN		TIG		FA		RFP		SXT	
		CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.	CIM	Fenót.
12T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
13T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
14T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
15T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
16T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
17T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	1	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
18T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
19T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
20T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
21T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
22T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	1	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S
28T	<i>S. aureus</i>	2	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,12	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 10	S

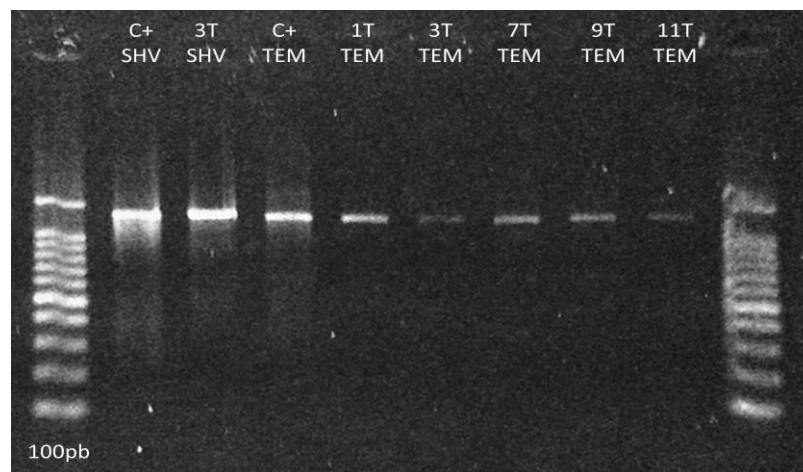
Legenda: LNZ: Linezolida; TEC: Teicoplanina; VAN: Vancomicina; TGC: Tigeciclina; FA: Ácido Fusídico; RFP: Rifampicina; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol; CIM: Concentração Inibitória Mínima; Fenót: Fenótipo; S: Sensível.

5. 4 Detecção genotípica de resistência a antimicrobianos

5.4.1 Detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}

Dentre as amostras de bactérias Gram-negativas testadas, 31,25% delas (5/16) foram positivas para pelo menos um dos genes codificadores de ESBL pesquisados. A presença do gene *bla*_{TEM} foi detectada em cinco amostras do nosso estudo, sendo elas uma amostra de *E. coli*, uma de *K. pneumoniae* e três de *P. aeruginosa* (identificadas como 1T, 3T, 7T, 9T, 11T, respectivamente). A amostra de *K. pneumoniae* (3T) foi a única a apresentar resultado positivo para o gene *bla*_{SHV}, enquanto nenhuma amostra isolada nesse estudo foi positiva para o gene *bla*_{CTX-M}.

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose de PCR para pesquisa dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}



Legenda: C+: Controle positivo; pb: pares de bases;

5.4.2 Detecção dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}

Todas as amostras de bactérias Gram-negativas selecionadas nesse estudo obtiveram resultado negativo para os genes codificadores das MBLs testadas.

5.4.3 Detecção dos genes *bla*_Z e *mecA*

Todas as amostras de *S. aureus* avaliadas nesse estudo foram positivas para o gene *bla*_Z, conforme demonstrado no Apêndice B. Em contrapartida, nenhuma amostra foi detectada com o gene *mecA*.

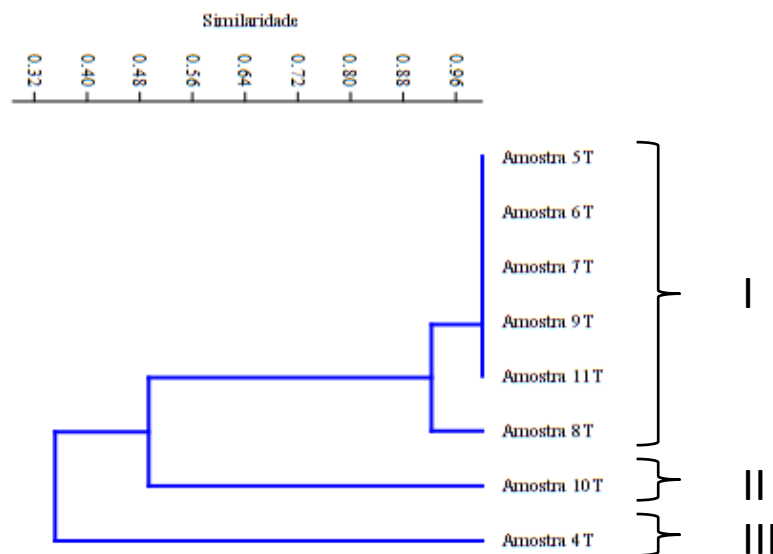
5.5 Sequenciamento

O sequenciamento do gene *bla_{SHV}* foi realizado para a confirmação da amplificação. Com uma semelhança de 96%, o gene amplificado foi identificado como *bla_{SHV}* presente em linhagens de *Klebsiella pneumoniae*.

5.6 Caracterização de similaridade genética das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas

O DNA das oito amostras de *P. aeruginosa* foi submetido à análise por RAPD com os iniciadores CagA2 e CMVin2. A eletroforese em gel de agarose e o Quadro 5, contendo o tamanho dos fragmentos obtidos nessa reação, podem ser encontrados no Apêndice C. Para a análise de similaridade, apenas as bandas presentes entre 2000pb e 200pb foram selecionadas e cada amostra isolada apresentou entre seis e sete bandas.

Figura 8: Dendograma de amostras de *P. aeruginosa* isoladas de resíduos potencialmente infectantes e de trabalhadores que os manuseiam



O dendrograma formado pelos padrões gerados por meio do RAPD, demonstrado na Figura 8, revela três grupos distintos, sendo um deles representado por seis linhagens presentes nos resíduos (amostras 5T-9T e 11T). Dentro do *cluster* I, encontram-se cinco amostras originadas de um mesmo

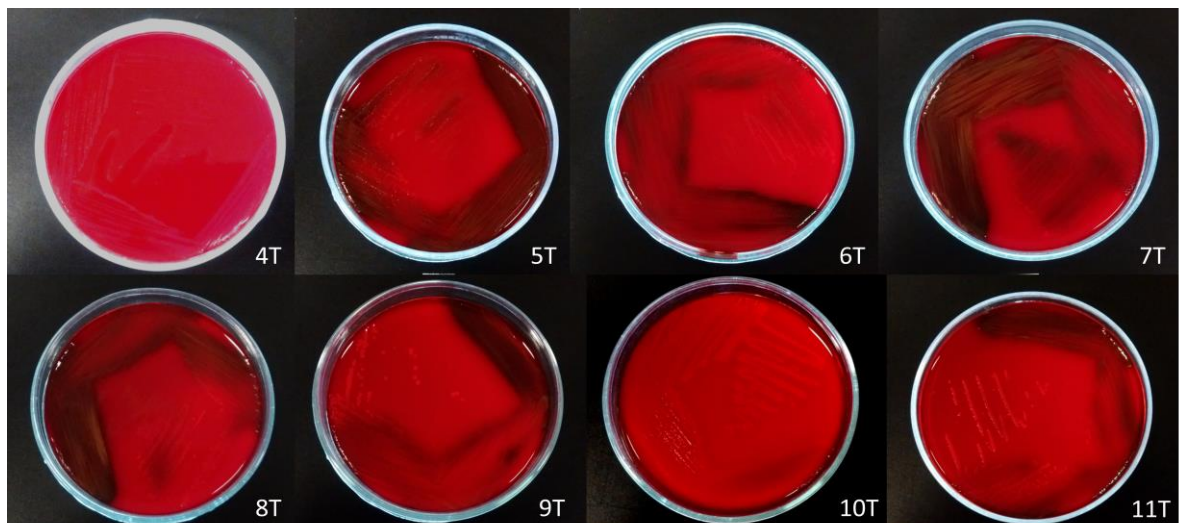
clone, juntamente com a amostra 8T, que apresentou mais de 90% de similaridade quando comparada com as outras linhagens presentes no grupo. As amostras 10T, isolada nos resíduos e 4T, isolada nas mãos do funcionário, apresentaram baixa similaridade com as outras amostras desse estudo.

5.7 Detecção fenotípica da formação de biofilme em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*

5.7.1 Produção de Substância Polimérica Extracelular

Das amostras de *P. aeruginosa* isoladas, aquela recuperada nas mãos do funcionário (identificada como 4T) foi a única a apresentar colônias vermelhas, indicando resultado negativo para a produção de EPS. Todas as outras linhagens foram positivas para esse teste, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Produção de EPS por amostras de *P. aeruginosa*

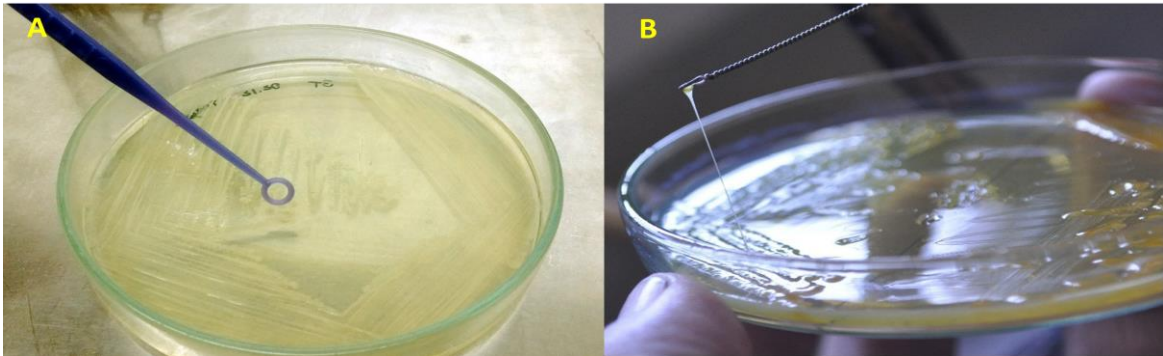


Legenda: Amostras de *P. aeruginosa* identificadas de acordo com sua numeração. A linhagem número 4T foi isolada das mãos do trabalhador, enquanto as outras foram isoladas dos resíduos infecciosos.

5.7.2 Avaliação da hipervirulência (hipermucosividade) da amostra de *K. pneumoniae*

A amostra de *K. pneumoniae* isolada apresentou resultado negativo para a avaliação de hipervirulência, demonstrado na Figura 10a. Para ser considerada hipervirulenta a colônia deve apresentar um resultado superior a 5 mm no teste do fio, conforme mostra a Figura 10b.

Figura 10 – Teste do fio para avaliação de hipervirulência em *K. pneumoniae*



Legenda: A) Resultado negativo de hipervirulência para a amostra de *K. pneumoniae* isolada neste estudo. B) Exemplo de resultado positivo para a hipervirulência (segundo Sharma *et al.*, 2015).

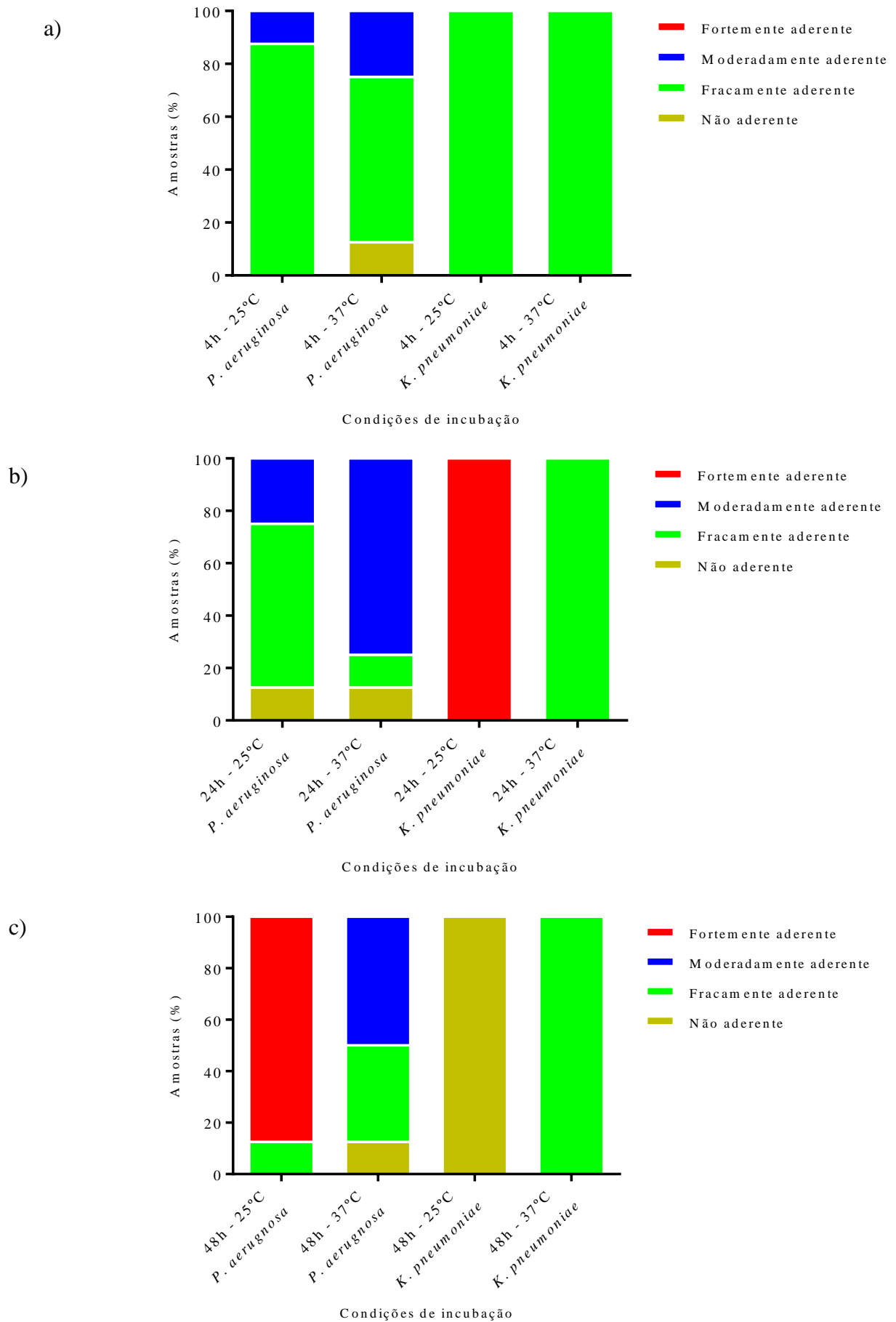
5.7.3 Aderência de biofilme por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em microplacas de poliestireno

O Gráfico 3 demonstra a aderência de biofilme da amostra de *K. pneumoniae* e das oito amostras de *P. aeruginosa* isoladas nesse estudo de acordo com a temperatura e o tempo de incubação. O Quadro 6, presente no Apêndice D, mostra a aderência bacteriana de cada uma das amostras, em todas as temperaturas testadas.

No ensaio de aderência de biofilme em microplacas, a amostra de *P. aeruginosa* isolada nas mãos do funcionário (4T), que não apresentou produção de EPS, foi não aderente em todos os períodos de tempos avaliados na temperatura de 37°C e também em 24 horas a 25°C. Essa mesma amostra foi fracamente aderente durante 4 horas e 48 horas de incubação a 25°C.

Conforme mostrado no Gráfico 3, as amostras de *P. aeruginosa* avaliadas foram mais aderentes a 25°C, temperatura na qual 87,5% das amostras avaliadas foram fortemente aderentes durante 48 horas de incubação. Nesse mesmo tempo, apenas 50% delas foram moderadamente aderentes quando incubadas a 37°C. Nessa temperatura, o melhor resultado foi observado em 24 horas, no qual 75% das espécies foram moderadamente aderentes. Já o biofilme produzido por amostras de *K. pneumoniae* se tornou fortemente aderente após a incubação de 24 horas, na temperatura de 25°C. A 37°C, em todos os tempos de incubação, a amostra apresentou a formação de um biofilme fracamente aderido.

Gráfico 3: Aderência do biofilme formado por amostras de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em diferentes condições de incubação



Legenda: a) Aderência do biofilme formado pelas amostras de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* durante 4 horas de incubação, a 37° e a 25°C. b) Aderência do biofilme durante 24 horas de incubação, em ambas as temperaturas testadas. c) Aderência do biofilme durante 48 horas, em ambas as temperaturas avaliadas.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram abordadas questões relativas aos dados pessoais e profissionais de funcionários que manuseiam os resíduos, bem como informações sobre o seu risco e gerenciamento. Com o questionário de Oliveira (2013), dados e informações que evidenciam pontos falhos nesses aspectos foram coletados para que se possa evitar que os trabalhadores constituam um papel importante na etapa de ‘transmissão’ da cadeia de infecção citada no item 2.1.2.1, na introdução desse estudo (WHO, 2014). Ainda com o objetivo de avaliar uma possível transmissão, a presença de micro-organismos nas mãos, aventais e fossas nasais desses profissionais foi investigada e detectada. Com a coleta dos resíduos, verificou-se a presença inadequada de objetos perfurocortantes em resíduos potencialmente infectantes, os quais podem causar acidentes de trabalho, oferecendo uma ‘porta de entrada’ para os micro-organismos, na cadeia de infecção. Por fim, objetivou-se entender quais eram os ‘agentes infecciosos’ presentes nesses resíduos potencialmente infectantes e nos funcionários, seu perfil e a presença de genes de resistência aos antimicrobianos. Além disso, avaliou-se sua capacidade de formação de biofilme, a qual tem como consequência o desenvolvimento de uma reserva de patógenos e genes de resistência no ambiente.

Conforme demonstraram os resultados desse estudo, a equipe de trabalhadores é composta por 11 mulheres e um homem, em sua maioria na faixa etária de 41 a 50 anos, com ensino fundamental incompleto e mais de dois anos de experiência na profissão. O grau de escolaridade foi similar àquele encontrado no estudo de Gomes e Abegg (2007), que avaliou funcionários do departamento de limpeza urbana de Porto Alegre, porém com uma maioria representada por homens.

Os profissionais avaliados da instituição são responsáveis pela limpeza da área administrativa e clínica e por coletar, transportar e manusear os resíduos sólidos odontológicos dos grupos A, B, D e E. Ao serem questionados sobre as cores dos sacos plásticos nos quais os resíduos infectantes e os comuns são acondicionados, todos responderam corretamente as cores branca e azul, respectivamente, conforme recomendações da ANVISA (2004a).

Embora todos os profissionais entendam que há risco de transmissão de doenças a partir de sua prática laboral e que existe a presença de micro-organismo nos resíduos por eles manipulados, muitos deles, principalmente os que apresentam menor escolaridade, confundem os conceitos de agente infeccioso, doença e espécimes clínicos, como ‘secreção’, por exemplo. Semestralmente, na instituição, são oferecidos a esses funcionários treinamentos obrigatórios de capacitação em relação à biossegurança e riscos ocupacionais. Acredita-se que a abordagem desses conceitos durante o curso seja importante para que haja o entendimento de que micro-organismos patogênicos podem ser encontrados em ambientes onde aparentemente não há nenhuma correlação com doenças como maçanetas ou outras superfícies inanimadas (WHO, 2009). Nesse treinamento são abordados temas sobre manuseio, tratamento e destinação dos resíduos de serviços de saúde, práticas de segregação, condutas em caso de derramamento dos resíduos e acidente ocupacional. Além disso, são realizadas exposições de relatórios sobre esse tipo de acidente na instituição, bem como esclarecimentos sobre o uso de Equipamento de Proteção Individual, medidas de prevenção e controle de riscos, com ênfase na lavagem de mãos.

A instituição segue corretamente as recomendações da OMS (WHO, 2014), que preconiza treinamentos constantes para toda a equipe de assistência à saúde. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a necessidade de comprovação da resposta imune contra o agente da Hepatite B deve ser mais enfatizada durante os treinamentos institucionais. De acordo com a ANVISA (2004a), os trabalhadores imunizados devem realizar controle laboratorial sorológico para avaliar a resposta imunológica, mas, apesar da adesão total à vacinação e da recomendação da Agência, apenas 16,7% confirmaram a imunização contra hepatite pelo teste Anti-HBS. O vírus da Hepatite B é um perigo ocupacional importante para profissionais que manuseiam resíduos de assistência à saúde, já que pacientes infectados podem transmitir o vírus por meio do sangue. Além disso, a prevalência da doença nesses profissionais já foi consistentemente demonstrada como sendo maior quando comparada com trabalhadores que manuseiam resíduos não clínicos (ANAGAW *et al.*, 2012).

Grande parte dos funcionários avaliados realizou treinamento de capacitação em relação à biossegurança há menos de seis meses da data de avaliação e apenas dois deles haviam realizado há mais de seis meses ou não souberam responder. Nesse último caso, o funcionário havia sido contratado há menos de três meses e ainda não tinha realizado o curso oferecido pela instituição. Quando questionados sobre a frequência de respingos ou gotículas

durante a manipulação dos resíduos, a maior parte da equipe respondeu que não são contaminados ao longo da jornada de trabalho. Resultados opostos foram relatados por Blenkarn and Odd (2008), que notaram respingos frequentes no peito, braços e pernas de todos os 15 funcionários durante a manipulação desses materiais. Os resultados do presente estudo sugerem que os funcionários são cuidadosos ao seguir os protocolos presentes na instituição para a manipulação e gerenciamento dos RSS, entretanto deve-se reforçar que a percepção dos mesmos em relação ao risco do manuseio de resíduos pode ser melhor trabalhada durante os treinamentos.

Embora todos os trabalhadores utilizem os equipamentos de proteção individual corretamente, seguindo as recomendações da ANVISA, um deles relatou acidente ocupacional na ponta dos dedos causado por objetos perfurocortantes. Segundo eles, a falta de atenção e o descarte incorreto destes materiais, por outros profissionais, são as principais causas de acidentes. Resultados similares foram encontrados no estudo de Barros *et al.* (2010), no qual 14 trabalhadores que manejam resíduos de serviços de saúde sofreram exposição biológica durante a jornada de trabalho, sendo que 68,7% das vezes foi causada por material perfurocortante descartado inadequadamente pela fonte geradora.

Durante o processo de segregação dos resíduos potencialmente infectantes realizado nesse estudo, foi encontrado um objeto perfurocortante descartado de forma incorreta pelos profissionais da instituição. De acordo com o Relatório do Sistema de Vigilância de Acidentes de Trabalho com material biológico em serviços de saúde brasileiros, desde 2002 até setembro de 2015, o manuseio de resíduos é a principal atividade que ocasiona o maior número de acidentes causados por agulhas ou objetos cortantes descartados inadequadamente. Durante esse período, 725 casos foram relatados e esse número pode estar subestimado, já que a notificação pelas instituições de saúde é voluntária (RISCOBIOLÓGICO.ORG, 2015).

Em países em desenvolvimento, o conhecimento do potencial risco dos resíduos infectantes ainda não é familiar para os profissionais de assistência à saúde, principalmente devido à falta de estudos focando o papel desses materiais como reservatórios de patógenos e na sua capacidade de causar infecções (HOSSAIN, 2011). Embora o corpo clínico e auxiliar da instituição avaliada nesse estudo também receba treinamento periódico de capacitação em relação à biossegurança e sobre o gerenciamento de resíduos, algumas práticas ainda são inadequadas na instituição e podem representar riscos para outros profissionais.

Mostafa, Shazly e Sherief (2009) avaliaram o conhecimento sobre o gerenciamento dos resíduos entre médicos, enfermeiros e cuidadores em um departamento cirúrgico de um hospital universitário no Egito. Os autores concluíram que os funcionários possuíam um conhecimento insatisfatório sobre o assunto e suas atitudes em relação ao gerenciamento dos resíduos também eram inadequadas. O estudo realizado por Bansal, Vashisth e Gupta (2013) demonstra que os profissionais da Odontologia não estão conscientes do sistema de cores utilizado para separar e acomodar os resíduos e ainda descartam materiais perfurocortantes de forma inapropriada. Por fim, uma pesquisa realizada na Índia demonstrou que os dentistas eram informados de modo inadequado sobre os agentes infecciosos de relevância na Odontologia, incluindo *P. aeruginosa* e outras importantes bactérias de relevância clínica. Além disso, esses profissionais não participavam do programa de treinamento para o gerenciamento de resíduos, resultando em segregação incorreta dos materiais na fonte geradora e potencial contaminação cruzada para os funcionários que os manuseiam (SINGH *et al.*, 2012). Esses trabalhos corroboram a necessidade de treinamentos periódicos com exposição de relatórios apontando os principais erros e os acidentes ocorridos com os profissionais na instituição, além de reforço teórico sobre conteúdos essenciais para um bom gerenciamento de resíduos.

Com a coleta de amostras realizada em superfícies dos funcionários e nos resíduos potencialmente infectantes, foram isolados nesse estudo 373 micro-organismos, sendo a maioria deles cocos Gram-positivos. Esse resultado já era esperado, considerando que grande parte da microbiota da pele e fossas nasais é formada por micro-organismos com essas características morfotintoriais (COGEN; NIZET; GALLO, 2008; FRANK *et al.*, 2010). Do total de amostras isoladas, 28 bactérias foram selecionadas para esse estudo devido à sua relevância clínica, sendo que 19 delas estavam presentes nas mãos ou fossas nasais de funcionários. Dentre as bactérias recuperadas nos resíduos, as amostras de relevância clínica, *P. aeruginosa* e *A. junii* foram selecionadas. Vieira *et al* (2011) e Hossain *et al* (2013) também isolaram em resíduos de instituição à assistência odontológica os mesmos gêneros de micro-organismos recuperados nos resíduos e nos funcionários desse estudo.

Nos resíduos, foram isoladas para estudos posteriores uma amostra de *C. albicans* e outras espécies do gênero foram encontradas nas mãos, aventais e fossas nasais de sete funcionários da equipe. Das espécies não-*albicans* isoladas nos trabalhadores, *C. haemulonii* foi a mais frequente, representando 50% das amostras de leveduras recuperadas no estudo.

Embora essa espécie seja considerada rara entre o gênero *Candida* spp., esse micro-organismo merece atenção pela sua emergência como um patógeno oportunista associado à fungemia relacionada ao uso de cateteres, candidíases, surtos nas unidades de terapia intensiva neonatais, dentre outros quadros. No Brasil, o primeiro relato de fungemia causada por essa espécie ocorreu em São Paulo, no ano de 2012. Embora *C. haemulonii* esteja associada a altos níveis de resistência à antimicrobianos, dificultando o tratamento das infecções, a espécie isolada no País foi sensível à maioria dos antifúngicos testados no estudo (ALMEIDA JR *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2015).

A espécie bacteriana mais prevalente isolada nos funcionários foi *S. aureus*. Após a realização dos procedimentos fenotípicos para a detecção desse micro-organismo, foram identificadas 12 amostras, distribuídas nas fossas nasais direita e esquerda de três (25%) funcionários da equipe, todos do turno da tarde. Conforme descrito na literatura, cerca de 30% da população é colonizada por *S. aureus*, sugerindo que esse micro-organismo possa ser parte da microbiota permanente dos funcionários, sobretudo daquele identificado como número 08, considerando que a amostra foi isolada em suas fossas nasais em ambas as coletas realizadas nesse estudo (COGEN; NIZET; GALLO, 2008). A origem da contaminação dos trabalhadores por esse micro-organismo não pôde ser avaliada, já que não foram isoladas amostras Gram-positivas nos resíduos potencialmente infectantes. Rongpharpi, Hazarika e Kalita (2013) verificaram a presença de *S. aureus* em 22,2% das fossas nasais de trabalhadores de assistência à saúde de diversos setores. De acordo com os autores, a taxa de colonização pela espécie pode variar entre 16,8%-56,1%. Rashid *et al* (2012) observaram a presença de *S. aureus* em 51,8% dos trabalhadores sanitários e verificaram que a presença desse micro-organismo é mais elevada nesses funcionários, bem como em médicos e enfermeiros, quando comparados com trabalhadores da área administrativa.

Embora não tenha sido estabelecida a procedência das linhagens de *S. aureus* isolados a partir dos resíduos potencialmente infectantes, a manipulação dos resíduos gera bioaerossóis que podem conter micro-organismos, sendo necessária a utilização de máscaras durante o seu manuseio (HARRISON, 2007). A colonização das fossas nasais é um fator de risco para uma subsequente infecção por *S. aureus*. Em pelo menos 80% das bacteremias causadas pela espécie, o agente infeccioso é uma linhagem idêntica àquela colonizada previamente à instalação do quadro (FRANK *et al.*, 2010).

Todos os *S. aureus* recuperados nesse estudo apresentaram resistência apenas à benzilpenicilina e foram positivos para a presença do gene *blaZ*. A resistência à penicilina se iniciou na década de 40 e, no início de 1950, as taxas de resistência já demandavam novos antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por esse micro-organismo (MYLES; DATTA, 2012). No estudo de Hanberger *et al.* (2011), 70% das amostras de *S. aureus* isoladas em infecções de pacientes em unidades de terapia intensiva apresentaram resistência à penicilina, porcentagem menor do que à encontrada nesse estudo, porém ainda bastante elevada.

Duran *et al.* (2012) isolaram amostras de *S. aureus* e estafilococos coagulase negativos de amostras clínicas e detectaram uma ampla disseminação do gene *blaZ*, presente em 89,9% das 297 amostras isoladas. Chong *et al.* (2015) isolaram 220 amostras de *S. aureus* provenientes de bacteremia e observaram a presença do gene em 92% das espécies. Além disso, os autores associaram a presença desse gene também à resistência a cefazolina, uma cefalosporina de primeira geração utilizada para o tratamento de bacteremia em linhagens de *S. aureus* sensíveis a meticilina. De acordo com os autores, linhagens que expressam a β -lactamase do tipo A são capazes de aumentar significativamente a concentração inibitória mínima da cefazolina, quando a concentração bacteriana se encontra aumentada, reação denominada de efeito inóculo.

Nesse estudo, nenhuma amostra de *S. aureus* isolada foi positiva para o gene *mecA*. Embora essas espécies tenham sido sensíveis à oxacilina, o relatório do teste de susceptibilidade realizado pelo VITEK® 2 Compact alertou que todas as amostras poderiam ser linhagens com baixo nível de resistência à meticilina, sugerindo a realização de testes adicionais, para a confirmação da presença de MRSA. Uma baixa prevalência de MRSA também foi relatada por Rashid *et al* (2012), onde apenas 13,6% das 22 amostras de *S. aureus* isoladas de trabalhadores sanitários eram resistentes à meticilina.

Além da amostra de *S. aureus* isolada, o funcionário número 07 apresentou amostras de *E. coli* na fossa nasal esquerda em ambas as coletas e amostra de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* nas mãos. Esse profissional tem 24 meses de experiência na profissão, ensino fundamental incompleto e realizou o curso de capacitação de biossegurança há um ou dois anos atrás, diferentemente da maioria, que relatou a participação no curso há menos de seis meses. Além disso, esse profissional relatou que realiza a lavagem das mãos corretamente, antes e após cada procedimento de limpeza, antes e após o uso do toalete e antes das

refeições. Novamente, o resultado aponta para a importância de treinamentos regulares na instituição, abordando todos os funcionários.

A presença desses micro-organismos nas fossas nasais dos funcionários da instituição reforça, também, a importância do uso de máscaras como forma de minimizar a contaminação das mucosas dos profissionais, por meio do bioaerossol gerado pelos resíduos e também impedir a disseminação dos micro-organismos presentes nestes sítios. Além da possível contaminação por resíduos potencialmente infectantes, a presença de *E. coli* na fossa nasal do funcionário pode indicar uma contaminação por materiais fecais durante o processo de coleta de resíduos e limpeza do ambiente sanitário, considerando que essa espécie compõe cerca de 80% da microbiota intestinal humana (KORB, 2013). Machado *et al.* (2009) também isolaram amostras de *E. coli* nas fossas nasais de dois manipuladores de alimentos em um hospital universitário e discutiram práticas inadequadas de higiene por esses profissionais.

No presente estudo, o mesmo trabalhador foi encontrado carregando amostras de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* em suas mãos. De acordo com a OMS (WHO, 2014) e com o Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998), as mãos são importantes fontes de contaminação durante o manuseio incorreto de resíduos e os micro-organismos presentes nesses materiais podem causar diversas infecções no profissional. Além de um risco maior para o próprio funcionário, devido às características de seu trabalho, a presença de patógenos nas mãos desses trabalhadores pode ser um risco para imunossuprimidos, incluindo pacientes e outros profissionais de assistência à saúde (HOSSAIN, 2013). Embora nesse estudo tenham sido isoladas nos resíduos potencialmente infectantes apenas as amostras de *P. aeruginosa* e *A. junii* de relevância clínica, Hossain *et al* (2013) identificaram espécies que estavam presentes em nossos funcionários, como *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* em resíduos sólidos odontológicos na Malásia.

Como foram encontradas amostras de *P. aeruginosa* tanto nos resíduos quanto nas mãos de um funcionário, a análise de similaridade clonal por meio da técnica RAPD foi realizada. A possibilidade de se obter uma análise filogenética sem qualquer informação prévia do genoma da espécie, o baixo custo, a rapidez e a simplicidade tornam essa técnica atrativa para diversos pesquisadores (BINNECK; NEDEL; DELLAGOSTIN, 2002). Além disso, o RAPD tem sido recomendado como uma das ferramentas mais eficientes na caracterização da discriminação clonal de *P. aeruginosa* (RAO *et al.*, 2014).

Dentre as sete amostras de *P. aeruginosa* isoladas nos resíduos, cinco delas foram consideradas o mesmo clone, uma apresentou alta porcentagem de similaridade com esse grupo e a última obteve uma baixa similaridade com as outras seis amostras isoladas. Embora cinco espécies tenham apresentado 100% de similaridade, características fenotípicas como a morfologia das colônias e o grau de formação de biofilme são diferentes, bem como a presença de genes de resistência nessas espécies. Do mesmo modo, Rao *et al* (2014) não observaram correlação entre o RAPD e características fenotípicas das amostras, como o grau de aderência na formação de biofilme das linhagens e a mucosidade das colônias. Ainda segundo o autor, as características fenotípicas podem variar entre as linhagens como uma estratégia de adaptação ao ambiente em que se encontram. Já a presença de genes de resistência entre as diferentes amostras pode se justificar pela sua aquisição por algumas linhagens e não por outras, característica essa talvez não identificável pelo teste de RAPD. Caso fosse necessária uma confirmação precisa desse resultado, métodos mais discriminatórios poderiam ser utilizados, porém de custo mais elevado, como, por exemplo, o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE (VAEZ *et al.*, 2015).

Ao comparar o perfil gerado pelo RAPD da amostra isolada nas mãos do funcionário com as outras sete amostras de *P. aeruginosa* coletadas, a porcentagem de similaridade atingida foi baixa, indicando que as espécies isoladas nesse estudo de *P. aeruginosa* nas mãos e nos resíduos potencialmente infectantes não estão geneticamente relacionadas. Embora a contaminação dos funcionários por micro-organismos presentes nos resíduos não tenha sido comprovada, a presença de patógenos nas mãos, aventais e fossas nasais foi evidenciada, indicando falhas nos procedimentos de biossegurança.

Além da possível contaminação por superfícies inanimadas, o sistema de entrega de águas da instituição também pode ter sido outra possível fonte de transmissão de *P. aeruginosa* às mãos dos trabalhadores. Loveday *et al* fizeram uma revisão bibliográfica em 2014 e encontraram evidências plausíveis de transmissão de *P. aeruginosa* a partir dos sistemas de água de hospitais para os pacientes e vice-versa. Em alguns estudos, essa forma de contaminação foi hipotetizada, sugerindo que as mãos dos profissionais assim como a água utilizada para o cuidado com o paciente podem ser fontes de contaminação cruzada por esse micro-organismo. Outra hipótese sugerida é que essa contaminação tenha ocorrido por meio da retirada incorreta das luvas após o manuseio dos resíduos, podendo ser esse um assunto a ser abordado nos treinamentos institucionais (HESS *et al.*, 2013).

O perfil de resistência dos micro-organismos Gram-negativos de relevância clínica isolados nesse estudo foi variável. Em concordância com o nosso trabalho, Vieira *et al.* (2011) obtiveram uma alta taxa de resistência à ampicilina (59,4%) e à ceftriaxona (43,7%) entre as amostras de bactérias Gram-negativas isoladas nos resíduos sólidos da Odontologia. As amostras de *A. junii* isoladas neste estudo apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados pelo sistema Vitek® 2 Compact e não apresentou resultado positivo para nenhum gene de ESBL ou MBL testados.

Dentre as cinco amostras de *E. coli* isoladas na fossa nasal de um funcionário, três apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos e nenhum gene de resistência foi encontrado. As outras duas amostras apresentaram perfis de sensibilidade diferentes com resistência à ampicilina, cefalosporinas de segunda e terceira geração testadas, colistina e carbapenêmicos. Embora a amostra 2T tenha apresentado resistência aos carbapenêmicos testados, não foi observada a presença dos genes de MBLs no micro-organismo. Apenas a amostra de *E. coli* identificada como 1T apresentou o gene *bla*_{TEM}. Diwan *et al* (2102) isolaram amostras de *E. coli* provenientes de águas residuais hospitalares na Índia e também encontraram linhagens portadoras do gene *bla*_{TEM}. Embora as outras linhagens não possuam os genes de β -lactamases procurados, elas podem possuir outros mecanismos que conferem resistência, como por exemplo, a redução da permeabilidade pela diminuição da expressão de porinas, contribuindo para a resistência à cefalosporinas e carbapenêmicos e/ou a superexpressão de bombas de efluxo, do tipo AcrB, no caso de amostras de *E. coli*, que confere resistência a múltiplas drogas (BLAIR *et al.*, 2015).

A amostra de *K. pneumoniae* isolada apresentou um fenótipo de resistência apenas à ampicilina, embora tenha sido a espécie que obteve o maior número de genes de resistência avaliados, apresentando o gene *bla*_{TEM}, além de ser a única amostra a carrear o gene *bla*_{SHV}. Tavajjohi, Moniri e Khorshidi (2011) encontraram apenas sete linhagens produtoras de ESBL das 86 amostras isoladas em pacientes de um hospital universitário do Irã, no qual apenas uma foi positiva para o gene *bla*_{SHV}, corroborando a baixa prevalência do gene encontrado nesse trabalho. De acordo com o estudo de Silva e Lincopan (2012) sobre a epidemiologia das ESBLs no Brasil, apenas um tipo da enzima SHV é mais prevalente no estado de Minas Gerais e nenhum tipo da enzima TEM é relatada. Contrariando o nosso estudo, os autores relatam que a enzima CTX-M é a mais prevalente no estado, enquanto nenhum resultado positivo foi encontrado nas nossas amostras testadas. A presença de espécies sensíveis a

antimicrobianos, porém carreadoras de genes de resistência, também foi relatada por Pellegrino *et al* (2008) e Picão *et al* (2012), ambos os estudos realizados no Brasil. Os autores isolaram amostras de *P. aeruginosa* sensíveis à carbapenêmicos, porém portadoras dos genes codificadores de MBLs. De acordo com os autores, a combinação de outros mecanismos pode ser necessária para a conferência do fenótipo de resistência aos antimicrobianos, como a superexpressão de bombas de efluxo ou a redução de porinas. Além disso, a espécie também pode apresentar uma maior permeabilidade em sua membrana, permitindo uma maior ação do antimicrobiano.

Todas as linhagens de *P. aeruginosa* isoladas nesse estudo tiveram o mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, incluindo resistência à penicilina, cefalosporinas e glicilciclinas. De acordo com Magiorakos *et al* (2012), as amostras desse trabalho são consideradas multidroga-resistentes por serem resistentes a três ou mais classes ou subclasses de agentes antimicrobianos. A emergência de linhagens resistentes a múltiplos antimicrobianos vem se tornando uma ameaça significativa à saúde pública, já que cada vez mais existem poucos ou nenhum antimicrobiano disponível para o tratamento de infecções bacterianas.

Nos últimos anos, as taxas de resistência às cefalosporinas de terceira geração e imipenem vêm aumentando em *P. aeruginosa* (HIRSCH; TAM, 2010). Nossos resultados revelaram resistência a essa classe pela espécie, estando de acordo com a literatura. Entretanto, felizmente, essas amostras são susceptíveis à aminoglicosídeos, carbapenêmicos, quinolonas e outras classes avaliadas, reduzindo a efetividade limitada a antimicrobianos que ocorre quando essas amostras se tornam altamente resistentes. Além disso, nenhuma amostra desse estudo foi positiva para os genes codificadores de MβLs testados. De forma similar, Mendes *et al.* (2009), Moayednia *et al.* (2014) e Lari *et al.* (2015) identificaram uma baixa prevalência desses genes no gênero *Acinetobacter* spp. e nas espécies de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

Três amostras de *P. aeruginosa* isoladas nos resíduos potencialmente infectantes foram positivas para o gene *bla*_{TEM}. Uma pesquisa recente conduzida no Irã também avaliou a presença de genes codificadores de ESBL em *P. aeruginosa* e obteve resultados similares aos desse estudo, sendo o gene correspondente à enzima TEM aquele predominante (BOKAEIAN *et al.*, 2015). Juntamente com as amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae*, esse gene foi o mais prevalente isolado nesse estudo. Entretanto, nem todas as amostras de *P. aeruginosa* que

apresentaram o fenótipo de resistência foram positivas para os genes de ESBLs testados. Conforme já citado para *E. coli*, outros mecanismos podem ser responsáveis pela conferência de um fenótipo de resistência como a redução da expressão das porinas ou a superexpressão de bombas de efluxo multirresistentes (BLAIR *et al.*, 2015).

O conhecimento da produção de biofilme e a presença dos genes de resistência nessas amostras podem ajudar a alertar os profissionais a tomarem medidas de biossegurança mais eficazes, não apenas para sua própria proteção, mas para evitar a disseminação de patógenos e genes de resistência no ambiente a partir de sua prática laboral, evitando a contaminação de superfícies, instrumentos, pacientes e outros profissionais da saúde (VIEIRA *et al.*, 2011; ABDALLAH *et al.*, 2014).

Bactérias da família Enterobacteriaceae e espécies de *P. aeruginosa* podem fazer parte do biofilme de pacientes com doenças periodontais, presença essa que vem sendo fortemente associada com infecções no trato respiratório (COLOMBO *et al.*, 2013). Foi demonstrada também a presença de *P. aeruginosa* em instrumentos odontológicos como seringas de ar/água e brocas de alta velocidade, aumentando o risco de contaminação para o paciente por essa bactéria extremamente ubíqua (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Para verificar a capacidade das amostras de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* de formar biofilme, foram verificadas a hipervirulência e a produção de EPS das amostras, respectivamente, além da verificação da aderência do biofilme formado. A amostra de *K. pneumoniae* não obteve o fenótipo de hipervirulência avaliado, entretanto o biofilme se mostrou fortemente aderente quando incubado a 25°C, após um período de 24 horas e fracamente aderente em todos os períodos de tempo avaliados, a 37°C. Fernandes *et al.* (2015) isolaram amostras de *K. pneumoniae* provenientes de lagos e obtiveram resultado semelhante ao deste estudo, com uma formação de biofilme maior a 25°C quando comparada com a temperatura de 37°C.

Nosso trabalho demonstrou a produção de EPS por todas as linhagens avaliadas, exceto por aquela isolada nas mãos do funcionário. Esse resultado foi consistente com a não-aderência ou a fraca aderência do biofilme formado por essa amostra no ensaio com microplacas, considerando que essa substância é responsável pela integridade físico-química do biofilme (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

No ensaio de microplacas, as amostras de *P. aeruginosa* isoladas nesse estudo apresentaram melhor aderência à 25°C, após um período de 48 horas de incubação, enquanto que a 37°C a maioria das amostras apresentou apenas um biofilme moderadamente aderido. Resultados similares foram encontrados no estudo de Pedrosa *et al.* (2014) no qual essas espécies isoladas de águas minerais engarrafadas eram mais aderentes quando incubadas a 25°C. Zeraik e Nitschke (2012) encontraram o mesmo resultado e descreveram que a adesão do biofilme em *P. aeruginosa* aumenta de forma inversamente proporcional à temperatura de incubação.

A facilidade com que amostras de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* formam biofilmes fortemente aderentes à temperatura ambiente destaca a importância do processo de desinfecção diário de superfícies fixas, mobiliário e do instrumental de assistência à saúde. Uma prática de limpeza correta e frequente das superfícies pode resultar em redução da contaminação de mãos e aventais de profissionais da saúde (HESS *et al.*, 2013). Além disso, reforça-se que esse processamento deveria ser realizado em pequenos intervalos de tempo, considerando que o início da formação de biofilme por essas amostras ocorre após 4 horas em condições ambientais. Destaca-se também a necessidade de procedimentos corretos de antissepsia nas mãos, conforme o protocolo institucional, para evitar a disseminação desses micro-organismos e uma possível formação de uma reserva de patógenos e genes de resistência para o ambiente.

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- A equipe de funcionários que manuseia e gerencia os resíduos é composta por 11 mulheres e um homem, em sua maioria na faixa etária de 41 a 50 anos, com ensino fundamental incompleto e mais de dois anos de experiência na profissão. Todos os funcionários estavam cientes das cores dos sacos preconizados para o acondicionamento dos resíduos infectantes e dos resíduos comuns. A maioria dos trabalhadores realizou treinamento de capacitação em relação à biossegurança há menos de seis meses da data da entrevista, mas ainda confundem conceitos de agente infeccioso, doença e espécimes clínicos. Todos os membros da equipe estavam imunizados contra Hepatite B (embora nem todos realizaram o exame comprovatório), Tétano e utilizavam todos os EPIs necessários. Apenas um deles relatou acidente ocupacional com objeto perfurocortante e a equipe cita falta de cuidado e descarte incorreto por outros profissionais como a principal causa desses acidentes.
- Foram isolados 373 micro-organismos nos 12 funcionários e no líquido lixiviado, em ambas as coletas realizadas nesse estudo. Dentre eles, 320 foram identificados como cocos Gram-positivos, 30 como bastonetes Gram-negativos, 11 como bastonetes Gram-positivos e 12 como leveduras. Durante a segregação dos materiais semelhantes à domiciliares dos resíduos potencialmente infectantes, foi encontrado um objeto perfurocortante descartado de maneira incorreta.
- Nos funcionários, foram identificadas 19 amostras bacterianas, das quais 12 são *S. aureus*, cinco são *E. coli*, uma *P. aeruginosa* e uma de *K. pneumoniae*. Nos resíduos, foram identificadas nove amostras sendo sete *P. aeruginosa* e dois *A. junii*. Onze leveduras foram isoladas nos funcionários, sendo seis pertencentes à espécie *Candida haemulonii*, duas *C. guilliermondii*, duas *C. parapsilosis* e uma *C. famata*. Nos resíduos, foi isolada apenas uma amostra de *C. albicans*.
- Aproximadamente 60% das amostras de bactérias Gram-negativas isoladas nesse estudo foram resistentes à ceftriaxona e a cefuroxima e mais da metade delas apresentaram resistência à ampicilina e cefoxitina. Todas as bactérias apresentaram-se sensíveis aos aminoglicosídeos e à fluoroquinolona testados, bem como à cefepima.

- O gene *bla*_{TEM} foi detectado em cinco amostras do nosso estudo, sendo elas uma amostra de *E. coli*, uma de *K. pneumoniae* e três de *P. aeruginosa*. A amostra de *K. pneumoniae* foi a única a apresentar resultado positivo para o gene *bla*_{SHV}, enquanto nenhuma amostra isolada nesse estudo foi positiva para o gene *bla*_{CTX-M}.
- Todas as amostras de bactérias Gram-negativas selecionadas nesse estudo obtiveram resultado negativo para os genes codificadores de MBLs testados.
- Todas as amostras de *S. aureus* isoladas nesse estudo foram positivas para o gene *bla*_Z, mas nenhuma para o gene *mecA*.
- Dentre as sete amostras de *P. aeruginosa* isoladas nos resíduos, cinco delas foram consideradas provenientes do mesmo clone, uma apresentou alta porcentagem de similaridade com esse grupo e a última obteve uma baixa similaridade com as outras seis amostras isoladas. A amostra de *P. aeruginosa* recuperada nas mãos apresentou baixa similaridade com as outras, indicando que essas linhagens não estão geneticamente relacionadas. Embora esse trabalho não tenha comprovado a contaminação dos funcionários por micro-organismos nos resíduos, a presença de patógenos nas mãos, aventais e fossas nasais foi evidenciada.
- Das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas, aquela recuperada nas mãos do funcionário foi a única a não apresentar a produção de EPS. No ensaio de biofilme, as amostras de *P. aeruginosa* foram mais aderentes a 25°C, temperatura na qual 87,5% das amostras apresentaram-se fortemente aderentes durante 48 horas de incubação. A 37°C, o melhor resultado foi observado em 24 horas, na qual 75% das espécies foram moderadamente aderentes. A espécie de *K. pneumoniae* não foi identificada como hipervirulenta. Seu biofilme se tornou fortemente aderente após a incubação de 24 horas, na temperatura de 25°C. A 37°C, em todos os tempos de incubação, a espécie apresentou a formação de um biofilme fracamente aderido.

Os resultados desse estudo nos forneceram informações importantes sobre o perfil e o conhecimento dos trabalhadores que manuseiam os resíduos potencialmente infectantes em uma instituição pública de assistência odontológica. Juntamente com os resultados do questionário, o descarte incorreto de materiais e a presença de micro-organismos patogênicos com importante perfil de resistência nas mãos e fossas nasais

de funcionários nos alertam sobre a necessidade de programas de treinamento regulares com todos os profissionais da instituição abordando questões como o descarte correto de perfurocortantes, vacinação, medidas de higiene das mãos, bem como reforço teórico sobre conteúdos essenciais para um bom gerenciamento de resíduos. Além disso, a capacidade das amostras de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, presentes nas mãos do funcionário, de formar biofilmes fortemente aderentes à temperatura ambiente destaca a importância do processo de desinfecção contínuo de superfícies e materiais de assistência à saúde. Esse procedimento impediria a disseminação desses micro-organismos e a formação de uma reserva de patógenos e genes de resistência para o ambiente, por meio da formação do biofilme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, Marwan *et al.* Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, p. 453-72, Jul 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Serviços odontológicos: prevenção e controle de riscos**. Brasília: Editora Anvisa, 2006. 156p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução no 306, de 07 de dezembro de 2004. Diário Oficial da União, 10 de Dezembro de 2004a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Brasília, 2004b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Microbiologia clínica para controle de infecções relacionadas à assistência à saúde - Detecção e identificação de bactérias de importância médica. 2013a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Microbiologia clínica para controle de infecções relacionadas à assistência à saúde - Detecção e identificação de fungos de importância médica. 2013b.

AL-CHARRAKH, Alaa H.; OBAYES Mohammed H. First Record of Isolation and Characterization of Methicillin Resistant *Staphylococcus lugdunensis* from Clinical Samples in Iraq. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 2014 p. 1-8, 2014.

ALMEIDA JR, João Nobrega *et al.* First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. **Clinics**, v. 67, n. 10, p. 1229-31, 2012.

ANAGAW, Belay *et al.* Seroprevalence of hepatitis B and C viruses among medical waste handlers at Gondar town Health institutions, Northwest Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 1-10, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS (ABRELPE). **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil**. São Paulo, 2013. 114p.

BANSAL, Mohit; VASHISTH, Shelja; GUPTA, Nighi. Knowledge, awareness and practices of dental care waste management among private dental practitioners in Tricity (Chandigarh, Panchkula and Mohali). **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 3, n. 2, p. 72-6, 2013.

BARROS, Dayane Xavier *et al.* Exposição a material biológico no manejo externo dos resíduos de serviço de saúde. **Cogitare Enferm**, v. 15, n. 1, p. 82-6, 2010.

BAZRAFSHAN, E. *et al.* Dental solid waste characterization and management in Iran: a case study of Sistan and Baluchestan Province. **Waste Management & Research**. v. 32, n. 2, p. 157-64, Fev 2014.

BECEIRO, Alejandro; TOMÁS, María; BOU, Germán. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, Abr 2013.

BINNECK, Eliseu; NEDEL, Jorge Luiz; DELLAGOSTIN, Odir A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 183-96, 2002.

BLAIR, Jessica M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, Jan 2015.

BLENKHARN, J. I.; ODD, C. Sharps Injuries in Healthcare Waste Handlers. **The Annals of Occupational Hygiene**, v. 52, n. 4, p. 281-6, Jun 2008.

BOKAEIAN Mohammad *et al.* 2015. Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-M Genes in Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Extended Spectrum β -Lactamases. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-6, Jan 2015.

BUSH, Karen. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549-59, Ago 2013.

BUSH, Karen; FISHER, Jed F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 455-78, 2011.

BUSH, Karen; JACOBY, George A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-76, Mar 2010.

CHONG, Y. P. *et al.* Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 2, p. 349-55, Fev 2015.

CLARKE, Simon R; DYKE, Keith G H. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus* β -lactamase operon are inducible. **Microbiology**, v. 147, p. 803-810, Abr 2001.

COGEN, A.L; NIZET, V.; GALLO, R.L. Skin microbiota: a source of disease or defence? **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 3, p. 442-455, Mar 2008.

COLOMBO Arnaldo L. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-23, Ago 2006.

COLOMBO Andrea V. *et al.* Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1592-1600, Out 2013.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução número 358, de 29 de abril de 2005. Publicada no DOU n. 84, de 4 de maio de 2005, Seção 1, p. 63-65.

DABROWSKI, Waldemar, *et al.* Optimisation of AP-PCR fingerprinting discriminatory power for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, n. 1, p. 51-7, Jan 2003.

DAL PONT, Cristiane Bardini *et al.* Estudo de Composição Gravimétrica dos Resíduos Sólidos Urbanos de Seis Municípios de Pequeno Porte do Sul de Santa Catarina. **4º Fórum Internacional de Resíduos Sólidos**. 2013, Porto Alegre.

DEORUKHKAR, Sachin C; SAINI, Santosh; MATHEW, Stephen. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology**, p. 1-6, Abr 2014.

DIJKSHOORN, Lenie; NEMEC, Alexandr; SEIFERT, Harald. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939-51, Dez 2007.

DIWAN, V. *et al.* Identification of extended-spectrum β -lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 857-9, Abr 2012.

DURAN, Nizami *et al.* Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in *staphylococci*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 3, p. 389-96, Mar 2012.

EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Annual epidemiological report. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. 2013.

EUZEBY. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesz.html>>. Acesso em: 27/11/2015a.

EUZEBY. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>>. Acesso em: 30/11/2015b.

EUZEBY. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>>. Acesso em: 04/12/2015c.

EUZEBY. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesmr.html>>. Acesso em: 06/12/2015d.

EUZEBY. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>>. Acesso em: 06/12/2015e.

FERNANDES, Vera *et al.* Avaliação do risco para a saúde pública resultante do contacto com águas recreativas e ornamentais. **Boletim Epidemiológico Observações**, n. 2, p. 7-11, 2015.

FINDLAY, J. *et al.* Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. **Clinical Microbiology Infection**, v. 18, n. 2, p. 140-6, Fev 2012.

FRANCO, Robson Maia. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. 2002. 153 f. Tese

(Doutorado) – Universidade Federal Fluminense. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, 2002.

FRANK, Daniel N *et al.* The Human Nasal Microbiota and *Staphylococcus aureus* Carriage. **Plos One**, v. 5, n. 5, p. 1-15, 2010.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE (FEAM). Manual de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Belo Horizonte, 2008.

GADDY, Jennifer A; ACTIS, Luis A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 273-8, Abr 2009.

GARCIA, Lúcia Maria *et al.* Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogaresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 2, Abr/Jun 2013.

GELLATLY, Shaan, L; HANCOCK, Robert E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Diseases**, v. 67, n. 3, p. 159-73, Abr 2013.

GESER, Nadine; STEPHAN, Roger; HÄCHLER, Herbert. Occurrence and characteristics of extended-spectrum b-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 21, p. 1-9, Mar 2012.

GIAMARELLOU, Helen; ANTONIADOU, Anastasia; KANELLAKOPOULOU, Kyriaki. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 2, p. 106-19, Ago 2008.

GOMES, Andréa Silveira, ABEGG, Claides. O impacto odontológico no desempenho diário dos trabalhadores do departamento municipal de limpeza urbana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 8, p. 1707-14, Jul 2007.

GUZMAN-BLANCO, Manuel *et al.* Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 4, p. 304-8, Out 2009.

HAAGSMA, J. A. *et al.* Infectious disease risks associated with occupational exposure: a systematic review of the literature. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 69, n. 2, p. 140-6, Fev 2012.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Oxford University Press**, n. 41, p. 95-8, 1999.

HANBERGER Håkan *et al.* Increased mortality associated with meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in the Intensive Care Unit: results from the EPIC II study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 4, p. 331-5, Out 2011.

HARRISON, E. Z. Health impacts of composting air emissions. **ByoCicle**, v. 48, n. 11, p. 44-50, 2007.

HESS, A. S. *et al.* A randomized, controlled trial of enhanced cleaning to reduce contamination of healthcare worker gowns and gloves with multidrug-resistant bacteria. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 5, p. 487-93, Mai 2013.

HIRSCH, Elizabeth B; TAM, Vincent H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v. 10, n. 4, p. 441-51, Ago 2010.

HONG, Duck Jin *et al.* Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 81-97, Jun 2015.

HOSSAIN, S. *et al.* Clinical solid waste management practices and its impact on human health and environment – A review. **Waste Management**, v. 20, n. 4, p. 754-66, Abr 2011.

HOSSAIN, S. *et al.* Infectious Risk Assessment of Unsafe Handling Practices and Management of Clinical Solid Waste. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 2, p. 556–567, Jan 2013.

HULL, Mark W; CHOW, Anthony W. Indigenous Microflora and Innate Immunity of the Head and Neck. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 21, n. 2, p. 265-82, Jun 2007.

INÁCIO, Hanoch S. M. Phenotypic and Genotypic Diversity of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections Recovered in the Hospitals of Belo Horizonte, Brazil. **Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 54-62, Nov 2014.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). Diagnóstico dos resíduos Sólidos de Serviço de Saúde. Brasília, 2012.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). Sustentabilidade ambiental no Brasil: biodiversidade, economia e bem-estar humano. Livro 7. Brasília, 2010.

JOLY-GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 11, p. 868-73, Nov 2005.

JONES, C. H. *et al.* Characterization and Sequence Analysis of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Encoding Genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates Collected during Tigecycline Phase 3 Clinical Trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 465-475, Fev 2009.

KAPER, James B; NATARO, James P; MOBLEY, Harry L T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-40, Fev 2004.

KORB, Arnildo *et al.* Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, n. 1, p. 72-9, 2013.

LARI, A. R. *et al.* Low prevalence of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a tertiary burn care center in Tehran. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 384-9, Set 2015.

LEE, Jung Hun; BAE, Il Kwon; LEE, Sang Hee. New Definitions of Extended-Spectrum β -Lactamase Conferring Worldwide Emerging Antibiotic Resistance. **Medical Research Reviews**, v. 32, n. 1, p. 216-32, Jan 2012.

LI, Bei *et al.* Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071-81, 2014.

LIVERMORE, David M. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-84, Out 1995.

LIVERMORE, David M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 14, sup 1, p. 3-10, Jan 2008.

LOVEDAY, H.P. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. **Journal of Hospital Infection**, v. 86, n. 1, p. 7-15, Jan 2014

MACHADO, Juliana R *et al.* Avaliação microbiológica das mãos e fossas nasais de manipuladores de alimentos da unidade de alimentação e nutrição de um hospital universitário. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 42, n. 4, p. 461-5, 2009.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology Infection**, v. 18, p. 268-81, 2012.

MARTINEAU, Francis *et al.* Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 231-38, Fev 2000.

MARTINEZ, J.L; BAQUERO, F. Antibiotics and the Evolution of Antibiotic Resistance. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-9, Dez 2009.

MARTINS, Hanoch S. I. *et al.* Resistance makers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 2, p. 1465-78, Jan 2014.

MAYER, François L; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-28, Fev 2013.

McDOUGALD, Diane *et al.* Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1. p. 39-50, Nov 2011.

MENDES, Rodrigo *et al.* Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 55-59, 2009.

METRI, B.C.; JYOTHI, P.; PEERAPUR, B. V. Detection of ESBL in *E.coli* and *K. pneumoniae* isolated from urinary tract infection. **Indian Journal of Nephrology**, v. 22, n. 5, p. 401-402, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2616, de 12 de Maio de 1998. **Diário Oficial da União**, 1998.

MOAYEDNIA, Reza *et al.* Frequency assessment of β -lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 19, Sup. 1, p. S41-5, Mar 2014.

MORGAN, D. J. *et al.* Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. v. 31, n. 7 p. 716-21, Jul (2010).

MOSTAFA, Gehan M. A; SHAZLY, Mona M; SHERIEF, Wafaa I. Development of a waste management protocol based on assessment of knowledge and practice of healthcare personnel in surgical departments. **Waste Management**, v. 29, n. 1, p. 430-39, Jan 2009.

MYLES, Ian A.; DATTA, Sandip K. *Staphylococcus aureus*: an introduction. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 181-84, Mar 2012.

NAIME, RAMALHO e NAIME. Avaliação do sistema de gestão dos resíduos sólidos do hospital de clínicas de porto alegre. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 9, n. 1, p. 1-17, Dez 2008.

NEVES, M. A. **Colonização das fossas nasais de acadêmicos de medicina por staphylococcus aureus resistente à metilina, relacionada ao tempo de exposição no ambiente hospitalar.** 2007. 140 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, São Paulo, 2007.

OLIVEIRA, Ana Cláudia *et al.* Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains from dental office environments and units in Barretos, state of São Paulo, Brazil, and analysis of their susceptibility to antimicrobial drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 679-84, 2008.

OLIVEIRA, C. A. S. **Perfil dos profissionais que manuseiam resíduos sólidos potencialmente infectantes em serviços de saúde da odontologia: relevância da abordagem do tema e proposta de avaliação do contexto atual.** 2013. 57f. Monografia (Especialização em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

OLSEN, John Elmerdahl; CHRISTENSEN, Henrik; AARESTRUP, Frank Moller. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 450-60, Mar 2006.

PARK, H. *et al.* Detection and hazard assessment of pathogenic microorganisms in medical wastes. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 44, n. 10, p. 995-1003, Ago 2009.

PATERSON, David L. *et al.* Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3554-60, Nov 2003.

PEDROSA, Aline Pereira *et al.* Assessment of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural mineral water. **Revista Ambiente e Água**, v. 9, n. 2, p. 313-24, 2014.

PELEG, Anton Y.; SEIFERT, Harald; PATERSON, David L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-82, Jul 2008.

PELLEGRINO, Flávia L. P. C. *et al.* A carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain carrying the bla_{SPM} gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, n. 2, p. 214-16, Jun 2008.

PENDLETON, Jack N; GORMAN, Sean P; GILMORE, Brendan F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 3, p. 297-308, Mar 2013.

PEREIRA, Lynette, A. *et al.* Real-Time PCR Assay for Detection of blaZ Genes in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1259-61, Abr 2014.

PEREIRA, Sónia Margarida dos Santos Gonçalves. *Pseudomonas aeruginosa* em um ambiente termal. Prevalência e determinantes de patogenicidade. 2013. 218 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

PEREZ, L. R. R. *et al.* Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 476-9, Abr-Jun 2011.

PICÃO, Renata Cristina *et al.* Metallo- β -lactamase-production in meropenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk for silent spread. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 747-51, Set 2012.

PLATA, Konrad; ROSATO, Adriana E.; WEGRZYN, Grzegorz. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597-612, Dez 2009.

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, Sup. 4, p. 23-31, Nov 2004.

RAMOS, Livia S *et al.* *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 111-15, 2015.

RAO, Amita Shobha *et al.* RAPD-PCR typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Peripheral Venous Catheters. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 462-65, 2014.

RAPARRINI, C. & REINHARDT, E. L. Manual de implementação – Programa de Prevenção de acidentes com materiais perfurocortantes em serviços de saúde. Riscobiologico.org e Fundacentro, 2010.

RASHID, Zermina *et al.* Prevalence of nasal *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital personnel and associated risk factors. **Acta Polonae Pharmaceutica**, v. 69, n. 5, p. 985-991, 2012.

REWATKAR, A. R.; WADHER, B. J. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* – biofilm formation Methods. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 8, n. 5, p. 36-40, 2013.

RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079-81, Abr 2008.

RISCO BIOLÓGICO.ORG. Relatório PSBio – Sistema de Vigilância de Acidentes de Trabalho com Material Biológico em Serviços de Saúde Brasileiros. 2015

RODRÍGUEZ-BAÑO, Jesús *et al.* Risk Factors and Prognosis of Nosocomial Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1726-31, Mai 2010.

RONGPHARPI, Sharon Rainy; HAZARIKA, Naba Kumar; KALITA, Hitesh. The prevalence of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers at a tertiary care hospital in Assam with special reference to MRSA. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 2, p. 257-60, Fev 2013.

ROSCHANSKI, Nicole *et al.* Development of a Multiplex Real-Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-Type AmpCs in Enterobacteriaceae. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 1-9, Jul 2014.

SHEHABI, Asem A; NAZZAL, Shatha A; DAJANI, Naheel. Putative Virulence Factors of *Candida* Species Colonizing Respiratory Tracts of Patients. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 16, p. 214-17, 2004.

SHARMA, Sandeep Kumar *et al.* Comparison of phenotypic characteristics and virulence traits of *Klebsiella pneumoniae* obtained from pneumonic and healthy camels (*Camelus dromedarius*). **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2, p. 116-22, Fev 2015.

SHON, Alyssa S; BAJWA, Rajinder P. S.; RUSSO, Thomas A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107-18, Fev 2013.

SIKARWAR, A. S.; BATRA, H. V. Identification of *Klebsiella Pneumoniae* by Capsular Polysaccharide Polyclonal Antibodies. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 2, n. 2, p. 130-4, Abr 2011.

SILVA, Ketrin Cristina; LINCOPAN, Nilton. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, Abr 2012.

SINGH, B.P. *et al.* Current biomedical waste management practices and cross-infection control procedures of dentists in India. **International Dental Journal**, v. 62, n. 3, p. 111-16, Jun 2012.

SNYDER, G. M. *et al.* Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on the gowns and gloves of healthcare workers. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 7, p. 583-9, Jul 2008.

STAPLETON, Paul D.; TAYLOR, Peter W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Science Progress**, v. 85, p. 57-72, 2002.

STEFANI, Stefania *et al.* Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 4, p. 273-82, Abr 2012.

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-79, Abr 2000.

STIEBER, Bettina *et al.* Direct, Specific and Rapid Detection of Staphylococcal Proteins and Exotoxins Using a Multiplex Antibody Microarray. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 1-16, Dez 2015.

STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, Abr 2002.

TAVAJJOHI Z.; MONIRI R.; KHORSHIDI A. Detection and characterization of multidrug resistance and extended-spectrum-beta-lactamase-producing (ESBLs) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in teaching hospital. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 20, p. 3223-28, Set 2011.

THAI, Quan K; PLEISS, Juergen. SHV Lactamase Engineering Database: a reconciliation tool for SHV b-lactamases in public databases. **BMC Genomics**, v. 11, p. 1-8, Out 2010.

THANBICHLER, Martin; SHAPIRO, Lucy. Getting organized — how bacterial cells move proteins and DNA. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 28-40, Jan 2008.

THE HUMAN MICROBIOME PROJET CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-14, 2012.

TIEW, K. *et al.* Municipal Solid Waste Composition Study at Universiti Kebangsaan Malaysia Campus. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4 n. 12, p. 6380-89, 2010.

TISSERA, Shehani; LEE, Sui Mae. Isolation of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) Producing Bacteria from Urban Surface Waters in Malaysia. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 20, n. 3, p. 14-22, Mai 2013.

TOMARAS, Andrew P *et al.* Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149, p. 3473-84, Dez 2003.

TRENTIN, Danielle da Silva; GIORDANI, Raquel Brandt; MACEDO, Alexandre José. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, Jul/Dez 2013.

VAEZ, Hamid *et al.* Antibiotic Resistance Patterns and Genetic Diversity in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Patients of a Referral Hospital, Isfahan, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 1-6, Ago 2015.

VALOT, Benoît *et al.* What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1-15, Mai 2015.

VIEIRA, Cristina Dutra *et al.* Composition analysis of dental solid waste in Brazil. **Waste Management**, v. 29, n. 4, p. 1388-91, Abr 2009.

VIEIRA, Cristina Dutra *et al.* Isolation of clinically relevant fungal species from solid waste and environment of dental health services. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 370-6, Out 2010

VIEIRA, Cristina Dutra *et al.* Count, identification and antimicrobial susceptibility of bacteria recovered from dental solid waste in Brazil. **Waste Management**, v. 31, n. 6, p. 1327-32, Jun 2011.

VIEIRA, Cristina Dutra *et al.* Ocorrência de infecção no pós-operatório de procedimentos odontológicos, em uma instituição pública, no período de 2010 a 2012. **Revista do CROMG**, v. 14, n.2, p. 20-7, 2013.

VISCA, Paolo; SEIFERT, Harald, TOWNER, Kevin J. *Acinetobacter* Infection – an Emerging Threat to Human Health. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1048-54, Dez 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, do português OMS). Safe management of wastes from healthcare activities. Segunda edição. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, do português OMS). WHO Guideline on hand hygiene in health care. 2009.

WU, Meng-Chuan *et al.* Isolation of Genes Involved in Biofilm Formation of a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Pyogenic Liver Abscess. **Plos One**, v. 6, n. 8 e23500, p. 1-11, Ago 2011.

ZERAIK Ana Eliza; NITSCHKE Marcia. Influence of Growth Media and Temperature on Bacterial Adhesion to Polystyrene Surfaces. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 569-76, 2012.

ZHAO, Wei-Hua; HU, Zhi-Qing. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Clinical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 79-101, Fev 2013.

APÊNDICE A -

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CLÍNICA

Título: “ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO / COLONIZAÇÃO DE TRABALHADORES QUE MANUSEIAM RESÍDUOS POTENCIALMENTE INFECTANTES EM UM SERVIÇO DE SAÚDE DA ODONTOLOGIA”

Pesquisadores: Simone Gonçalves dos Santos (Responsável pelo projeto)

Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Luiz de Macêdo Farias

Paula Prazeres Magalhães

Cristina Dutra Vieira

Thaysa Leite Tagliaferri

Introdução: Antes de aceitar a sua participação nesta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda a explicação a seguir sobre os procedimentos propostos. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também estabelece o direito de desistir da sua participação no estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados da pesquisa.

Objetivos: avaliar a contaminação e a provável colonização de sítios, por meio de análise molecular, do vestuário dos profissionais e também de regiões do corpo que estão em maior proximidade ou em contato com os resíduos potencialmente infectantes gerados em um serviço de saúde público da Odontologia.

Resumo: Os resíduos potencialmente infectantes gerados durante 24 horas de trabalho na instituição de saúde da Odontologia serão coletados e reservados para posterior pesagem e caracterização. A classificação utilizada para a separação dos resíduos divide os resíduos odontológicos em três categorias principais: resíduos potencialmente infectantes, não infectantes e semelhantes aos domiciliares. Após a separação e pesagem de todos os sacos plásticos, a porção considerada infectante será fracionada e lixiviada em solução salina e o líquido coletado será imediatamente transportado ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (UFMG). O delineamento do perfil dos profissionais que manuseiam os resíduos será realizado por meio de questionário estruturado e as coletas serão realizadas no início e encerramento da jornada de trabalho e trinta dias após a primeira coleta. As amostras serão coletadas em ambiente reservado e individualizado previamente estabelecido para impedir o constrangimento dos funcionários. Os sítios selecionados serão as fossas nasais, mãos e roupa dos profissionais. O que se propõem neste estudo é fazer a análise e identificação de possíveis microrganismos nas regiões coletadas e realizar uma comparação com aqueles recuperados diretamente dos resíduos. Toda a metodologia de coletas propostas neste estudo está embasada na literatura e fundamentada em referenciais científicos. Sendo assim, nenhum procedimento desconhecido ou que possa causar algum desconforto será utilizado.

Procedimento: Serão incluídos neste estudo profissionais da equipe de gerenciamento de resíduos potencialmente infectantes. Para a coleta das fossas nasais será utilizado um *swab* esterilizado, umedecido em soro fisiológico. O *swab* será inserido 1cm dentro da narina e serão feitos movimentos rotatórios para atingir toda a mucosa nasal por 10 a 15 segundos. O procedimento será realizado nas narinas direita e esquerda e, após a coleta, o material será transferido para meio adequado e transportado em ambiente isotérmico. As mãos e vestuário dos profissionais serão amostradas também com *swab* esterilizado e umedecido em água destilada que será passado nas duas mãos, iniciando pela mão não-dominante e seguida pela dominante. O *swab* será passado no dorso de cada dedo e serão realizados dois círculos na palma da mão com um movimento de espiral. No

vestuário, será desenhada a letra “W” na linha da cintura, na porção anterior do tronco. As amostras serão transferidas para meio adequado e transportadas em ambiente isotérmico para processamento. Você não receberá qualquer remuneração pela participação.

Desconfortos: O projeto não prevê nenhum procedimento diferente daquele recomendado para a realização de coletas com *swab* nasal.

Riscos: Não haverá riscos aos profissionais em função da pesquisa, pois só serão utilizados materiais e soluções esterilizados, sendo preservada a integridade dos trabalhadores.

Benefícios: Há carência de dados no que diz respeito ao estabelecimento de uma correlação direta da presença de microrganismos nos resíduos e seu posterior isolamento e constatação de colonização, pelos mesmos grupos, na indumentária e pele dos profissionais cuja ocupação é o manuseio e gerenciamento destes materiais. O estabelecimento dessa correlação pode auxiliar na prevenção de doenças infecciosas nestes profissionais e implantação de medidas acertadas de controle de infecções nos Serviços de Saúde. Portanto, a sua participação neste estudo será muito importante para o conhecimento dos microrganismos presentes nestes locais pesquisados e poderá contribuir, no futuro, para a melhoria da qualidade no trabalho para a categoria profissional e o gerenciamento adequado dos resíduos potencialmente infectantes.

Confidencialidade: Os resultados serão mantidos em sigilo até onde é exigido pela lei. O Comitê e Ética em Pesquisa da UFMG poderá verificá-los e ter acesso aos dados. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao concordar com a sua participação, você autoriza o pesquisador a coletar seus dados por meio de questionário e as amostras, por meio das coletas microbiológicas.

Desligamento: Você poderá se afastar, a qualquer momento, sem prejuízo para o seu acompanhamento médico. O estudo poderá ser finalizado se faltarem recursos e se o número de amostras não for suficiente.

Novas descobertas: Todos os novos dados desta pesquisa poderão ser fornecidos a você, quando solicitados.

Contato com o pesquisador: Pode ser feito pelos telefones (31) 3409-4592. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como participante da pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II – 2º andar – sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte – Minas Gerais; CEP.: 31270-901).

Consentimento: Li e entendi as informações. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Estou autorizando, voluntariamente, a minha participação, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte,.....dede 20.....

Profissional

Nome:.....

Idade:.....

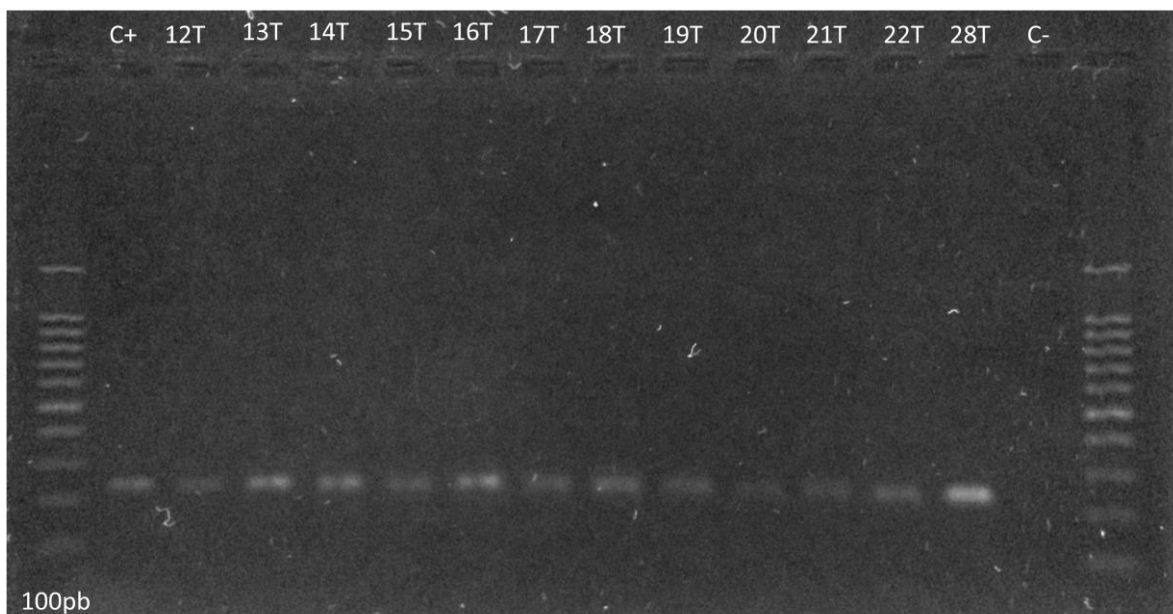
RG:

Endereço:.....

.....

Pesquisador responsável

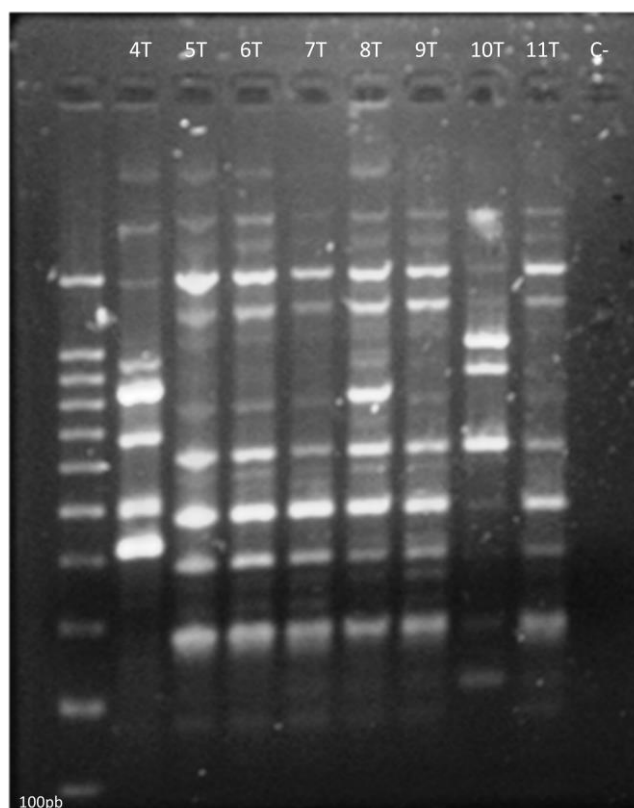
Nome:.....

APÊNDICE B – Produto de Reação em Cadeia da Polimerase para o gene *blaZ***Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose para o gene *blaZ* em *S. aureus*

Legenda: C+: Controle positivo; C-: Controle negativo. Padrão de 100 pb.

APÊNDICE C – Produto de Reação em Cadeia da Polimerase para RAPD: Eletroforese e bandas selecionadas para a análise

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose de PCR para RAPD



Legenda: pb: pares de bases. Eletroforese indicando padrões de bandejamento variando entre aproximadamente 190 pb até valores acima de 2.000 pb.

Quadro 5: Perfil genético das amostras de *P. aeruginosa* analisadas por RAPD e o tamanho das bandas amplificadas.

Amostras	Perfil	Tamanho das bandas (pb)
4T	III	2000, 950, 850, 700, 500, 425
5T	I	2000, 1500, 650, 500, 400, 300
6T	I	2000, 1500, 650, 500, 400, 300
7T	I	2000, 1500, 650, 500, 400, 300
8T	I	2000, 1500, 850, 650, 500, 400, 300
9T	I	2000, 1500, 650, 500, 400, 300
10T	II	2000, 1100, 950, 650, 300, 225
11	I	2000, 1500, 650, 500, 400, 300

APÊNDICE D – Adêrencia do biofilme de *P. aeruginosa*

Quadro 6: Fenótipo de aderência do biofilme das amostras de *P. aeruginosa* durante quatro, 24 e 48 horas de incubação.

Amostras	Condições de incubação					
	4 horas		24 horas		48 horas	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
3T	FA	FA	FTA	FA	NA	FA
4T	FA	NA	NA	NA	FA	NA
5T	FA	FA	FA	MA	FTA	FA
6T	FA	MA	MA	FA	FTA	MA
7T	FA	MA	MA	MA	FTA	FA
8T	FA	FA	FA	MA	FTA	MA
9T	MA	FA	FA	MA	FTA	MA
10T	FA	FA	FA	MA	FTA	MA
11T	FA	FA	FA	MA	FTA	FA

Legenda: NA: Não aderente; FA: Fracamente aderente; MA: Moderadamente aderente; FTA: Fortemente aderente.

**ANEXO A -
QUESTIONÁRIO**

Senhores(as), solicitamos a gentileza de responder o questionário abaixo e ressaltamos que não existem respostas certas ou erradas. Preencha com as suas experiências profissionais do dia a dia. **OBRIGADA!**

DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS	
<p>1- Gênero: ()Feminino [0] ()Masculino [1]</p> <p>2- Idade: _____ [anos]</p>	<p>3- Turno: _____</p>
<p>4- Grau de Escolaridade:</p> <p>() Não estudou [0]</p> <p>() Ensino Fundamental (incompleto) [1]</p> <p>() Ensino Fundamental (completo) [2]</p> <p>() Ensino Médio(incompleto) [3]</p> <p>() Ensino Médio (completo) [4]</p> <p>() Ensino superior (incompleto) [5]</p> <p>() Ensino superior (completo) [6]</p>	<p>5- Carga horária diária de trabalho : _____ [horas]</p> <p>6- Carga horária semanal de trabalho: _____ [horas]</p> <p>7- Tempo de profissão: _____ [anos]</p>
ACONDICIONAMENTO DOS RESÍDUOS	
<p>9. Você sabe qual é a cor do saco plástico correto para armazenar os resíduos infectantes?</p> <p><input type="checkbox"/> Sim [0] <input type="checkbox"/> Não [1] <input type="checkbox"/> Não sei [8] Se sim, qual ? _____</p>	
<p>10. No Centro Odontológico, qual a cor do saco plástico em que estes resíduos são acondicionados?</p> <p><input type="checkbox"/> Branco leitoso [0] <input type="checkbox"/> Preto [1] <input type="checkbox"/> Azul [2] <input type="checkbox"/> Vermelho [3] <input type="checkbox"/> Não sei [8]</p>	
<p>11. Você sabe qual é a cor do saco plástico correto para armazenar os resíduos comuns?</p> <p><input type="checkbox"/> Sim [0] <input type="checkbox"/> Não [1] <input type="checkbox"/> Não sei [8] Se sim, Qual ? _____</p>	
<p>12. No Centro Odontológico, qual a cor do saco plástico em que estes resíduos são acondicionados?</p>	

Branco leitoso [0] Preto [1] Azul [2] Vermelho [3] Não sei [8]

MANIPULAÇÃO E TREINAMENTOS

13. Você acredita na existência de microrganismos no lixo que você manipula?

Sim [0] Não [1] Não sei [8]

14. Há possibilidade da transmissão de doenças na sua prática profissional?

Sim [0] Não [1] Não sei [8]

15. Se você respondeu sim a uma das questões acima, quais são os microrganismos e as doenças que podem ser transmitidos durante as suas atividades profissionais?

[8] – O número deverá ser anotado quando ocorrerem outras respostas que não as solicitadas forem respondidas.

16. Você já recebeu algum curso de capacitação em sua área?

Sim [0] Não [1] Não sei [8]

17. Se sim, há quanto tempo este curso foi realizado?

Nos últimos 6 meses [0] 6 meses a 1 ano atrás [1] 1 a 2 anos atrás [2]

2 a 3 anos atrás [3] há mais de 3 anos [4] Não sei [8]

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL E VACINAÇÃO

18. Durante a manipulação dos resíduos de saúde você utiliza Equipamento de Proteção Individual?

Sim [0] Não [1] Não sei [8]

19. Estes equipamentos são fornecidos pela empresa em que você trabalha? Sim [1] Não [2] Não sei [8]

20. Marque com um x os equipamentos que você utiliza durante a manipulação dos resíduos dos serviços de

saúde.

() luvas de borracha Sim [0] Não [1]

() luvas de blindagem Sim [0] Não [1]

() gorro Sim [0] Não [1]

() máscara Sim [0] Não [1]

() avental de borracha Sim [0] Não [1]

() jaleco Sim [0] Não [1]

() óculos Sim [0] Não [1]

() botas Sim [0] Não [1]

() uniforme com calça Sim [0] Não [1]

() Não sei [8]

() nenhum

21. Ao manipular os sacos de resíduos estes soltam gotículas ou respingos em você? Sim [0] Não [1] Não sei [8]

22. Quantas vezes ao dia, em média, ocorre contaminação de partes do seu corpo por respingos ou gotículas?

Nenhuma [0] Uma vez [1] Duas ou três vezes [2] Mais de três vezes ao dia [3] Não sei [8]

23. Em quais partes do corpo estes respingos caem com maior frequência?

Olhos [0] Nariz [1] Boca [2] Tórax [3] Braço [4] Pernas [5] Mãos [6] Não sei [8]

OBS.: Anotar nos quadradinhos a ordem em que as partes foram citadas pelo funcionário.

24. Você já se acidentou com materiais perfurocortantes durante o manuseio dos resíduos odontológicos?

Sim [0] Não [1] Não sei [8]

25. Se sim, quantas vezes ao ano você já se acidentou com perfurocortantes?

Uma [0] Duas [1] Três [2] Quatro [3] Cinco ou mais vezes [4] Não sei [8]

26. Em qual parte do corpo estes acidentes aconteceram?

Dedos das mãos [0] Mãos [1] Antebraço [2] Braço [3] Pernas [4] Abdômen [5] Não sei [8]

27. Após o acidente você notificou aos responsáveis do setor o ocorrido? Sim [0] Não [1] Não sei [8]

28. Em sua opinião, qual é a principal causa de acidentes com perfurocortantes durante suas atividades laborais?

() falta de atenção [0] () cansaço [1] () descarte errado por outros profissionais [2] Não sei [8]

Outras: _____

29. Seu Cartão de vacinação está em dia? Sim [0] Não [1] Não sei [8]

30. Você é vacinado contra Hepatite B? Sim [0] Não [1] Não sei [8]

31. Você já fez o exame anti HBS para saber se está protegido contra Hepatite B? Sim [0] Não [1] Não sei [8]

32. Você é vacinado contra o Tétano? Sim [0] Não [1] Não sei [8]

33. Com que frequência você lava as mãos no ambiente de trabalho?

() antes e após cada procedimento de limpeza; antes e após uso de toaletes; antes das refeições [0]

() antes e após cada procedimento de limpeza [1]

() antes e após uso de toaletes [2]

() antes das refeições [3]

Outros: _____

34. Após acidentes com material biológico, qual a sua conduta?

() lavar o local com água e sabão e você notificar ao responsável do setor [0]

() notificar ao responsável do setor [1]

() lavar o local com água e sabão [2]

() lavar o local apenas com água [3]

- lavar o local e aplicar álcool ou outras soluções [4]
- pressionar o local e estimular o sangramento [5]
- nenhuma conduta é tomada[6]

[9] – Perda - Quando o participante se recusa a responder a questão, ou seja, quando nenhuma resposta for marcada.