



ANÁLISE DE POPULAÇÕES BACTERIANAS EM AMBIENTE HOSPITALAR E A PROSPECÇÃO DE LINHAGENS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS NO MUNICÍPIO DE CUITÉ – PB.

Amanda Geovana Pereira de Araújo¹, Igor Luiz Vieira de Lima Santos².

RESUMO

As bactérias são indispensáveis a vida na terra, sendo encontradas em qualquer lugar, como a pele, as mucosas e recobrimdo o trato intestinal dos homens e dos animais, bem como no âmbito hospitalar. Quando resistentes aos antibióticos podem dificultar o tratamento de infecções trazendo prejuízos à saúde. Este trabalho objetiva identificar bactérias em ambiente hospitalar e prospectar possíveis bactérias resistentes em Hospital do município de Cuité/PB. As amostras em triplicatas foram coletadas em seis pontos diferentes do Hospital, com auxílio de swab, posteriormente, foi realizado o cultivo microbiológico, contagem e isolamento de linhagens para futuras técnicas moleculares de identificação, ademais, essas bactérias foram expostas a concentrações específicas de Ampicilina para testar sua resistência. Os resultados obtidos demonstraram um alto grau de heterogeneidade e variabilidade fenotípicas das amostras, estas quando submetidas a diferentes concentrações do antibiótico específico apresentaram elevada persistência, o que torna um fato ainda mais preocupante, pois as infecções bacterianas aumentam a morbimortalidade dos indivíduos, com projeções de até 10 milhões para 2050. Assim, conclui-se que a identificação de microrganismos presentes no ambiente hospitalar é de grande importância científica, social e econômica, pois auxilia na busca por mecanismos de resistência aos antimicrobianos e na tomada de decisões pelo poder público na busca de soluções. Nesse sentido, também se faz importante a preocupação com relação ao uso indiscriminado de antibióticos pela sociedade, uma vez que é clara a presença de microrganismos resistentes, principalmente, em ambientes hospitalares.

Palavras-chave: Bactérias, Antibióticos, Hospital.

¹Graduanda em Bacharelado em Farmácia, Unidade Acadêmica de Saúde, UFCG, Cuité, PB, e-mail: amanda.cansenza@gmail.com

²Doutor em Biotecnologia, Professor Adjunto, Unidade Acadêmica de Biologia e Química, UFCG, Cuité, PB, e-mail: igorsantosufcg@gmail.com

***ANALYSIS OF BACTERIAL POPULATIONS IN A HOSPITAL ENVIRONMENT
AND THE PROSPECTION OF RESISTANCE LINES TO ANTIMICROBIALS IN THE
CITY OF CUITÉ - PB.***

ABSTRACT

Bacteria are indispensable for life on earth, being found anywhere, such as the skin, mucous membranes and covering the intestinal tract of men and animals, as well as in the hospital environment. When resistant to antibiotics they can hinder the treatment of infections, causing damage to health. This work aims to identify bacteria in a hospital environment and to search for possible resistant bacteria in a hospital in the city of Cuité / PB. Samples in triplicates were collected at six different points in the Hospital, with the aid of a swab. Subsequently, microbiological cultivation, counting and isolation of strains for future molecular identification techniques were carried out. Furthermore, these bacteria were exposed to specific concentrations of Ampicillin for test your stamina. The results obtained demonstrated a high degree of phenotypic heterogeneity and variability of the samples, these when submitted to different concentrations of the specific antibiotic showed high persistence, which makes it an even more worrying fact, since bacterial infections increase the morbidity and mortality of individuals, with projections of up to 10 million by 2050. Thus, it is concluded that the identification of microorganisms present in the hospital environment is of great scientific, social and economic importance, as it helps in the search for mechanisms of resistance to antimicrobials and in decision-making by the public authorities in the search of solutions. In this sense, concern about the indiscriminate use of antibiotics by society is also important, since it is clear the presence of resistant microorganisms, especially in hospital environments.

Keywords: Bacterias, Antibiotics, Hospital.

INTRODUÇÃO

As bactérias são organismos unicelulares com uma parede celular que envolve externamente a membrana plasmática, constituída por proteínas interligadas a polissacarídeos, formando um complexo denominado de peptidoglicano. Tal complexo é responsável pela forma e proteção tanto física quanto osmótica do organismo (SILVA, 2019). Esses microrganismos respondem a diversas ameaças ambientais, incluindo a presença de moléculas de antibióticos que podem comprometer sua existência (MUNITA; ARIAS, 2016).

Para Wu *et al.*, 2018 três caminhos existem para a resistência dos organismos, primeiro: a liberação de antibióticos na dose de sub-inibição resultante de atividades antrópicas exercendo uma pressão seletiva de longa duração sobre a comunidade microbiana. Em segundo lugar, bactérias resistentes podem continuar proliferando, disseminando e persistindo no meio ambiente. Em terceiro lugar, o transporte de genes de resistência aos antibióticos (ARGs) entre bactérias de diferentes espécies via transferência gênica horizontal (HGT) persistindo na comunidade microbiana ambiental.

À vista disso, os antibióticos são fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e reduziram mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas. Entretanto, o amplo uso de antimicrobianos nos âmbitos da saúde, pecuária e controle de doenças de plantas e animais durante os últimos 65 anos resultaram no rápido crescimento e prevalência global de microrganismos com multirresistência a antibióticos carregando muitos genes com esta finalidade (RAFRAF *et al.*, 2016; SELVARAJ *et al.*, 2018). Seu uso indiscriminado aumenta a pressão seletiva e, também, facilita a aquisição de mecanismos de resistência. Tal processo é considerado inevitável e irreversível, além de crescente (DE QUEIROZ, 2004).

A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema global que dificulta o tratamento de infecções bacterianas, tornando muitos aspectos da medicina moderna menos eficazes (BUCKNER, 2018). Tal fato exemplifica os efeitos causados pelos antibióticos quando introduzidos no meio, o que permite a obtenção de respostas rápidas pelas bactérias e conseqüentemente adaptações que resultam em mecanismos de resistência aos medicamentos, devido as mutações genéticas dos mais diversos tipos, o que proporciona a replicação dessas bactérias multirresistentes (FRACAROLLI; OLIVEIRA; MARZIALE, 2017).

A prevalência da resistência aos antibióticos é intimamente dependente do seu consumo indiscriminado no cotidiano humano, podendo gerar uma resistência individual, isto é, no paciente, mas também pode estimular maior resistência comunitária. A resistência coletiva a antibióticos é uma ameaça global, especialmente no que diz respeito às bactérias Gram-negativas, pois, a baixa permeabilidade da parede celular externa bacteriana foi identificada como uma barreira desafiadora que impede que um efeito antibiótico suficiente seja alcançado em doses baixas (BOADA, 2018; ROUSHAM, 2018).

O âmbito hospitalar é o local onde se encontra um excelente habitat para bactérias adquirirem resistência aos antibióticos. De um modo geral, o paciente internado está sujeito a diversas terapias medicamentosas que o torna susceptível a adquirir infecção hospitalar. Sendo assim, o perfil de resistência a antibióticos é quase exclusivamente baseado em amostras de pacientes hospitalizados, principalmente aqueles com doenças infecciosas graves e invasivas (BOADA *et al.*, 2018). Dessa forma, há vários fatores que podem contribuir para transmissão destes microrganismos nos serviços de saúde, como por exemplo: pacientes colonizados ou infectados, contaminação das mãos dos profissionais, além de outros (DE FREITAS, 2020).

Por conseguinte, a pesquisa possibilita um maior entendimento de como a resistência a antimicrobianos pode ser transmitida entre diferentes classes de microrganismos. Isto contribui para obtenção de informações que revelem quais bactérias estão presentes nesses ambientes, com isso é possível se precaver e compreender o aparecimento de microrganismos resistentes que afetam a saúde humana nos mais diversos locais ou até mesmo monitorá-los. O objetivo geral da pesquisa foi realizar um estudo de prospecção de bactérias presentes em amostras de ambientes hospitalares e identificar possíveis linhagens resistentes aos antimicrobianos no município de Cuité-PB.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas com auxílio de swabs e as mãos protegidas por luvas de látex desinfetadas com álcool 70% em tubos de 25 mL estéreis para evitar a contaminação. As coletas foram realizadas no Hospital Municipal de Cuité-PB, o município de Cuité situa-se na região centro-oeste do Estado da Paraíba, mesorregião do Agreste Paraibano e microrregião do Curimataú

Ocidental. Os locais de amostragem são de diferentes departamentos do hospital e foram coletados em triplicatas. Os locais P1 e P2 são de setores próximos e foram coletadas na maternidade e obstetrícia, respectivamente. Já os locais P3, P4 e P5 foram recolhidos na sala de urgência, no posto I e no laboratório. Enquanto o P6 está em uma área mais afastada das demais, a qual foi coletada no setor da pediatria. Todas as coletas foram respaldadas por acordo mútuo entre os pesquisadores e os representantes das instituições envolvidas tomando todas as precauções principalmente em tempos de pandemia. Devido a isto nós pesquisadores solicitamos confidencialidade institucional de qualquer dado exposto neste trabalho. Além do respeito ao acordo firmado e documentado entre ambas as partes.

As comunidades microbianas contidas em placas de petri foram desenvolvidas e obteve o crescimento desejado devido ao meio de cultivo rico LB (Luria Bertani) composto de 10g de Bacto Triptona, 5g de Extrato de Levedura, 10g NaCl e 1ml de NaOH 1N (Opcional), quando sólido foi utilizado 40g de Ágar Bacteriológico para 1L de água destilada.

Após o crescimento utilizando o meio LB sólido, as colônias de bactérias foram evidenciadas e, posteriormente, foi realizada a contagem, quando houve necessidade algumas das amostras passaram por um processo de diluição seriada, as quais, foram diluídas em quantidades específicas determinando um fator que em seguida foi multiplicado pela quantidade de colônias existentes. Este processo simplificou e diminuiu a quantidade de bactérias por placa, tornando a execução da contagem mais acertada e precisa.

Em seguida, os microrganismos foram isolados diante das suas características morfológicas para futuros testes moleculares. Esses isolados foram cultivados novamente em eppendorf contendo 1,5 ml do meio LB líquido, onde cada um deles cresceu por três dias, o que favoreceu um aumento de células e DNA dos microrganismos, facilitando, assim, a extração do material genético. Em relação ao desenvolvimento das bactérias resistentes foi utilizado o mesmo meio de cultivo acrescido de antibióticos específicos, a exemplo dos nossos experimentos foi utilizada a Ampicilina com a concentração final de 10ug/mL para cada amostra.

Outras concentrações de Ampicilina passaram a ser executadas na amostra do sanitário do banheiro da maternidade, uma vez que esta apresentou um maior

grau de multiplicidade bacteriológica. Nos testes para essa amostra utilizou-se as respectivas concentrações 10ug/mL, 50ug/mL, 100ug/mL, 150ug/mL.

As perspectivas para a continuidade do trabalho, em projeto PIBIC já aprovado que já está sendo executado, envolvem a extração do DNA genômico aplicando a metodologia com uso do CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio), o qual solubiliza membranas celulares e forma um complexo com o DNA, precipitando-o seletivamente. O material genético extraído está sendo quantificado por espectrofotometria observando-se a OD 260/280nm para uso nas reações de PCR para os genes 16S rDNA, os DNAs são diluídos para uma concentração final de 40ng/μl para a reações de PCR.

As reações de PCR estão sendo realizadas no termociclador (BIOER) contendo as seguintes concentrações 2,5mM de MgCl₂, 10nmole de DNTPs, 40ng de DNA molde, 40pmole de cada Primer, 2,5U de Taq DNA Polimerase (Taq Ludwig Biotec) e 2μl de Tampão de Enzima 10x, para um volume final de 20μl. O programa utilizado para as ampliações dos DNAs consiste em ciclos sucessivos de: desnaturação inicial de 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1min, 56°C por 30s, 72°C por 1min, e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os amplicons estão sendo analisados em gel de agarose (Loccus Biotecnologia Brasil) a 1,5% durante 1 hora a 80V e 80mA, corados com corante SYBR Gold, submetidos ao transiluminador.

Este trabalho prospectivo está em acordo com a Lei N° 13.123, de 20 de maio de 2015 e segue as normas do CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. Dito isto, a presente pesquisa cumpre todos os requisitos estabelecidos pela referida lei, bem como já está cadastrada no acesso ao patrimônio genético do SISGen e não realiza suas amostragens em humanos, apenas no ambiente hospitalar.

DESENVOLVIMENTO

A atuação das bactérias também merece destaque, elas são integrais e indispensáveis da vida na terra, sendo encontradas em qualquer lugar, como a pele, as mucosas e recobrimo o trato intestinal dos homens e dos animais, no ar, no solo (DE QUEIROZ, 2004). Algumas são consideradas comensais, residem no organismo e não trazem prejuízo a este, pelo contrário, protegem contra a colonização de bactérias consideradas patogênicas, por competir com estas por espaço e alimento.

Por essa razão, está interligada a elaboração de vários produtos, bem como a aplicação das reações anaeróbias da fermentação do açúcar e a conversão do leite. Da mesma forma, a produção de etanol por leveduras é explorada pela indústria cervejeira há milhares de anos e é usada na produção de combustíveis. Além dessas aplicações, uma das principais é a que diz respeito aos estudos para criação e desenvolvimento de novos antibióticos, um exemplo primordial é a penicilina. (GUIMARAES; MOMESSO e PUPO, 2010; PEREIRA e PITA, 2018).

Em contrapartida, as bactérias patogênicas podem persistir no organismo humano desencadeando doenças, estas são capazes de utilizar vários mecanismos para evitar o sistema imunológico do hospedeiro. Um dos principais problemas enfrentados mundialmente pelo setor de saúde pública são as infecções causadas por bactérias multirresistentes, as quais são responsáveis pelo aumento constante do tempo de internação e das mortes em todo o mundo. Estima-se que ocorram 700.000 mortes anuais em decorrência dessas infecções bacterianas, com projeções de até 10 milhões para 2050 (MOREIRA *et al.*, 2020).

Dados indicam que 25% a 35% dos pacientes hospitalizados fazem uso de antimicrobiano em algum momento da sua internação. A forma como a comunidade médica utiliza os antimicrobianos pode contribuir para a resistência. Deste modo, caracterizar a incidência e prevalência de bactérias assim como seu perfil de resistência ajuda para se ter um tratamento mais adequado (RIBEIRO; CORTINA, 2016). Paralelamente, o entendimento de profissionais da saúde é necessário à compreensão da cadeia infecciosa, pois estudos prévios apontam que tais conhecimentos sobre bactérias multirresistentes podem estar diretamente relacionados às taxas de infecção causadas por esses patógenos (ROCHA, 2019).

No âmbito da microbiologia há múltiplas atuações e para melhor entender é fundamental a utilização de métodos e técnicas moleculares, as quais permitem uma compreensão dos organismos específicos. Por exemplo, o sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rDNA que fornecem informações sobre a filogenia dos microrganismos, dessa forma, contribuindo para obtenção de resultados das produções científicas (HOU *et al.*, 2015).

Tais atuações englobam desde os métodos de manejo do laboratório: limpeza, descontaminação e desinfecção de materiais, preparos de meios de cultura, bem como reações em cadeia da polimerase (PCR), uma técnica rápida que permite a amplificação de regiões do genoma, a partir de mínimas quantidades de

DNA. Essas reações de PCR, tendo como alvo a região 16S rDNA, são direcionadas e têm sido utilizadas amplamente para estudar a diversidade procariótica possibilitando sua identificação e a predição de relações filogenéticas (VERA-GARGALLO *et al.*, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As bactérias possuem características patogênicas e trazem prejuízos a nossa saúde. Esses microrganismos estão presentes em todos os lugares e em ambientes hospitalares comprometem ainda mais a saúde dos indivíduos. Nessa perspectiva, os resultados obtidos demonstraram uma heterogeneidade no crescimento de bactérias para as seis áreas analisadas no Hospital Municipal de Cuité. Isto exemplifica a capacidade de reconhecer as linhagens resistentes a antibióticos que estão presentes.

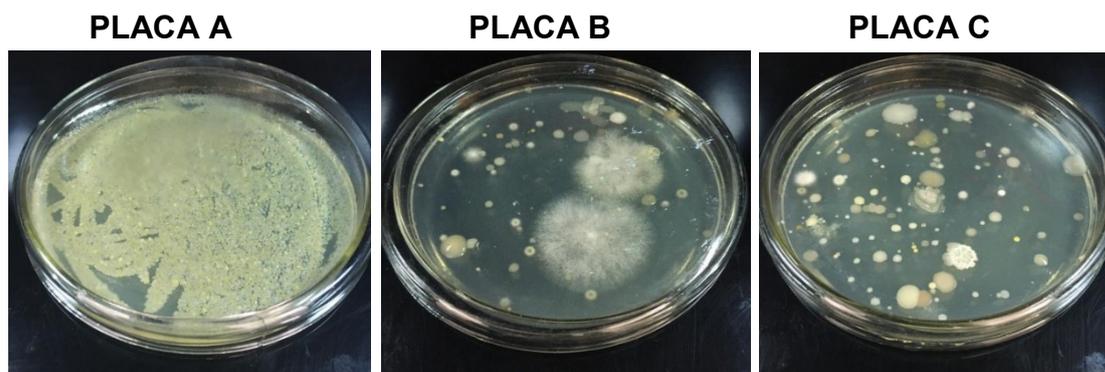
O conhecimento a respeito da diversidade microbiana é escasso, em parte, por nossa inaptidão de reproduzir em laboratório os princípios do ambiente nos diferentes tipos de ecossistemas e apesar dos avanços na ecologia microbiana, nas últimas duas décadas, os métodos tradicionais de cultivo parcialmente falharam em selecionar os possíveis microrganismos ecologicamente mais significativos. Contudo, o trabalho realizado tem a possibilidade de mostrar a dimensão e relevância da utilização de técnicas moleculares, facilitando a nossa compreensão da diversidade microbiana e da composição da comunidade no ambiente, bem como para uma maior prospecção de microrganismos resistentes e genes responsáveis por conferir a resistência antimicrobiana.

No presente trabalho os microrganismos cresceram em meio de cultivo rico em nutrientes, o que contribuiu para um crescimento rápido além de bons rendimentos para diversas espécies de bactérias, com isso, ocorreu à formação de colônias facilmente observáveis. O surgimento de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar tem sido progressivo e as infecções bacterianas aumentam a morbimortalidade, o período de permanência hospitalar e o custo dos cuidados de saúde, incluindo um elevado número de prescrições de antibióticos.

As amostras foram coletadas entre os meses de fevereiro e setembro de 2020, sendo possível a observação de uma gama de bactérias presentes nas localidades do hospital, em específico nas seis áreas analisadas. No quadro 1 a placa A referente ao sanitário do banheiro da maternidade demonstrou um enorme

número de colônias disponíveis, apresentando uma única característica morfológica, enquanto as demais placas referentes aos locais de coleta apresentaram características morfológicas significativas com tonalidades translúcidas, brancas, amareladas, alaranjadas, avermelhadas e marrons.

Quadro 1: Amostras em triplicatas do banheiro da maternidade coletadas no Hospital de Cuité (P1): placa A – sanitário; placa B – pia; placa C – barra de apoio.



Data da coleta: 13 de fevereiro de 2020



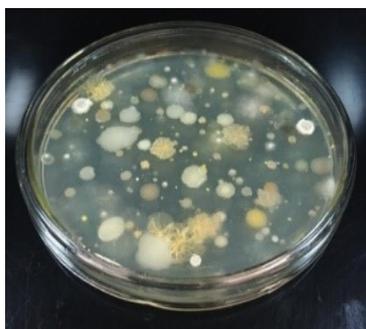
Data da coleta: 05 de setembro de 2020

Fonte: autoria própria.

Nos quadros 1 ao 6 é possível observar a diversidade de bactérias presentes nesses ambientes bem como sua quantidade.

Quadro 2: Amostras de bactérias coletadas na obstetrícia (P2): placa A – berço; placa B – maca; placa C – equipamento.

PLACA A



PLACA B



PLACA C



Data da coleta: 13 de fevereiro de 2020



Data da coleta: 05 de setembro de 2020

Fonte: autoria própria.

Quadro 3: Amostras de bactérias coletadas na sala de urgência (P3): placa A – bancada; placa B – armário de medicação; placa C – maca.

PLACA A



PLACA B



PLACA C



Data da coleta: 13 de fevereiro de 2020



Data da coleta: 05 de setembro de 2020

Fonte: autoria própria.

Quadro 4: Amostras de bactérias coletadas no posto da urgência (P4): placa A – armário de medicação; placa B – mesa de recepção; placa C – maçaneta.

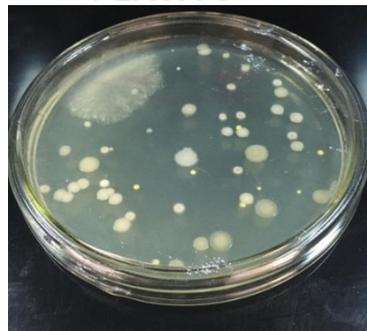
PLACA A



PLACA B



PLACA C



Data da coleta: 13 de fevereiro de 2020

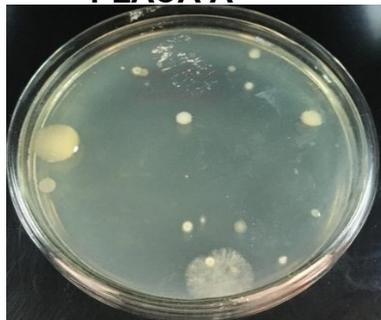


Data da coleta: 05 de setembro de 2020

Fonte: autoria própria.

Quadro 5: Amostras de bactérias coletadas no laboratório de análises clínicas do Hospital Municipal de Cuité (P5): placa A – maçaneta; placa B – equipamento; placa C – bancada.

PLACA A



PLACA B



PLACA C



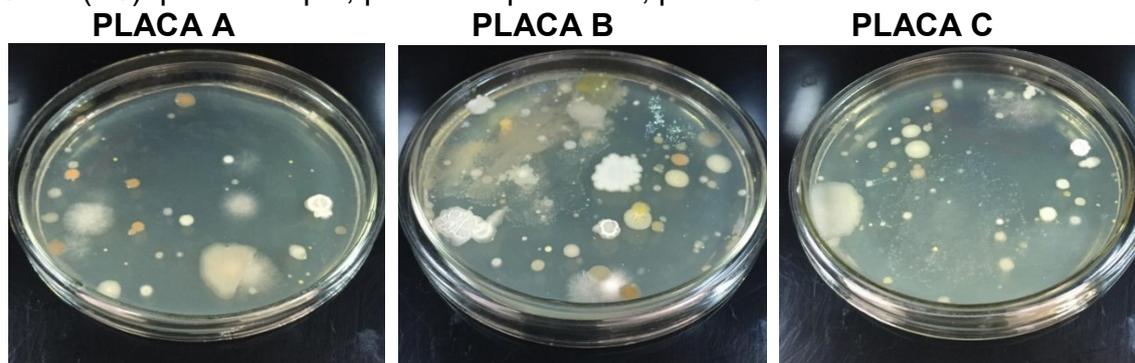
Data da coleta: 13 de fevereiro de 2020



Data da coleta: 05 de setembro de 2020

Fonte: autoria própria.

Quadro 6: Amostras de bactérias coletadas na pediatria do Hospital Municipal de Cuité (P6): placa A – pia; placa B – prateleira; placa C – armário.



Data da coleta: 13 de fevereiro de 2020

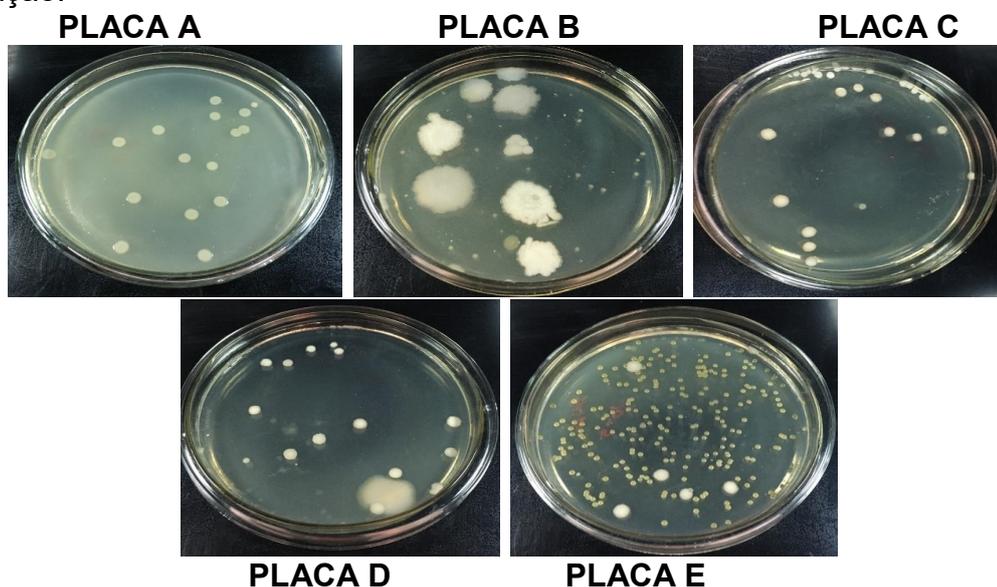


Data da coleta: 05 de setembro de 2020

Fonte: autoria própria.

Após o cultivo, as amostras que apresentaram alto grau de variabilidade e assim ficaram impossibilitadas de realizar a contagem, passaram por diluições seriadas, visando amplificar o fator de diluição que é designado pelo número total de unidades de volume em que as amostras foram dissolvidas. No quadro 7, observam-se as amostras que foram diluídas: a pia e sanitário do banheiro com fatores 10^{-7} e 10^{-4} , respectivos; a maca e o berço do setor da obstetrícia com fatores 5 e 4; e o armário de medicação do âmbito da sala de urgência, cujo fator de diluição foi 5. Posteriormente, multiplica-se cada fator desse pela quantidade de colônias da amostra correspondente e dessa forma, consegue ter um controle e média da quantidade dessas colônias, facilitando o processo da contagem.

Quadro 7: Amostras de bactérias com diluições seriadas, coletadas no banheiro, obstetrícia e sala de urgência do Hospital Municipal de Cuité, nesta ordem: placa A – pia; placa B – sanitário; placa C – maca; placa D – berço; placa E – armário de medicação.

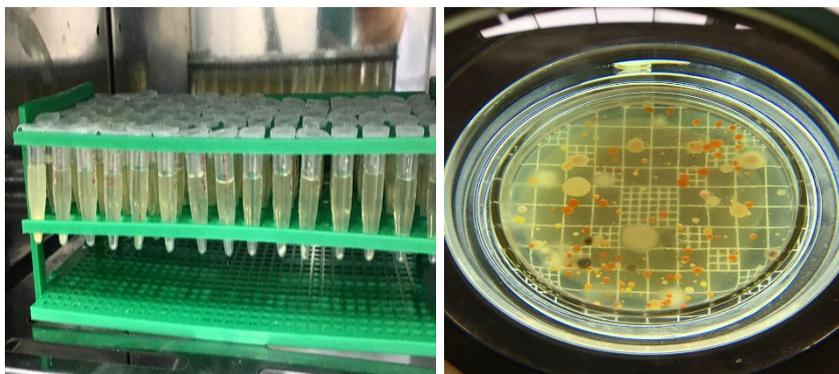


Fonte: autoria própria.

As demais amostras não demonstraram necessidade de realizar diluição seriada, assim, a contagem foi realizada com auxílio de um contador de colônias. Esse procedimento foi executado atingindo o valor final das unidades formadoras de colônias (UFCs), a partir da média obtida através das triplicatas de cada placa. Em seguida, foram descritas 160 amostras isoladas no relatório parcial e 175 no relatório final, tal fato explica a diversidade e dimensão microbiana desse local. Assim, diversas atividades no ambiente hospitalar deixam os pacientes mais susceptíveis e expostos a bactérias resistentes, como por exemplo, a internação prolongada dos pacientes. O quadro 8 retrata os isolados cultivados em meio líquido e o equipamento utilizado para contagem.

Essa quantidade de amostras demonstra o trabalho monumental que está sendo realizado, na expectativa de poder identificar pontualmente cada microrganismo presente neste ambiente utilizando técnicas de biologia molecular que após testadas e validadas poderão ser utilizadas rotineiramente para monitoramento desse e outros ambientes hospitalares. Ainda mais nesta época de pandemia onde qualquer infecção oportunista pode significar vida ou morte do paciente em questão.

Quadro 8: Isolados cultivados em eppendorf e exemplo do equipamento utilizado para execução da contagem das amostras.



Fonte: autoria própria.

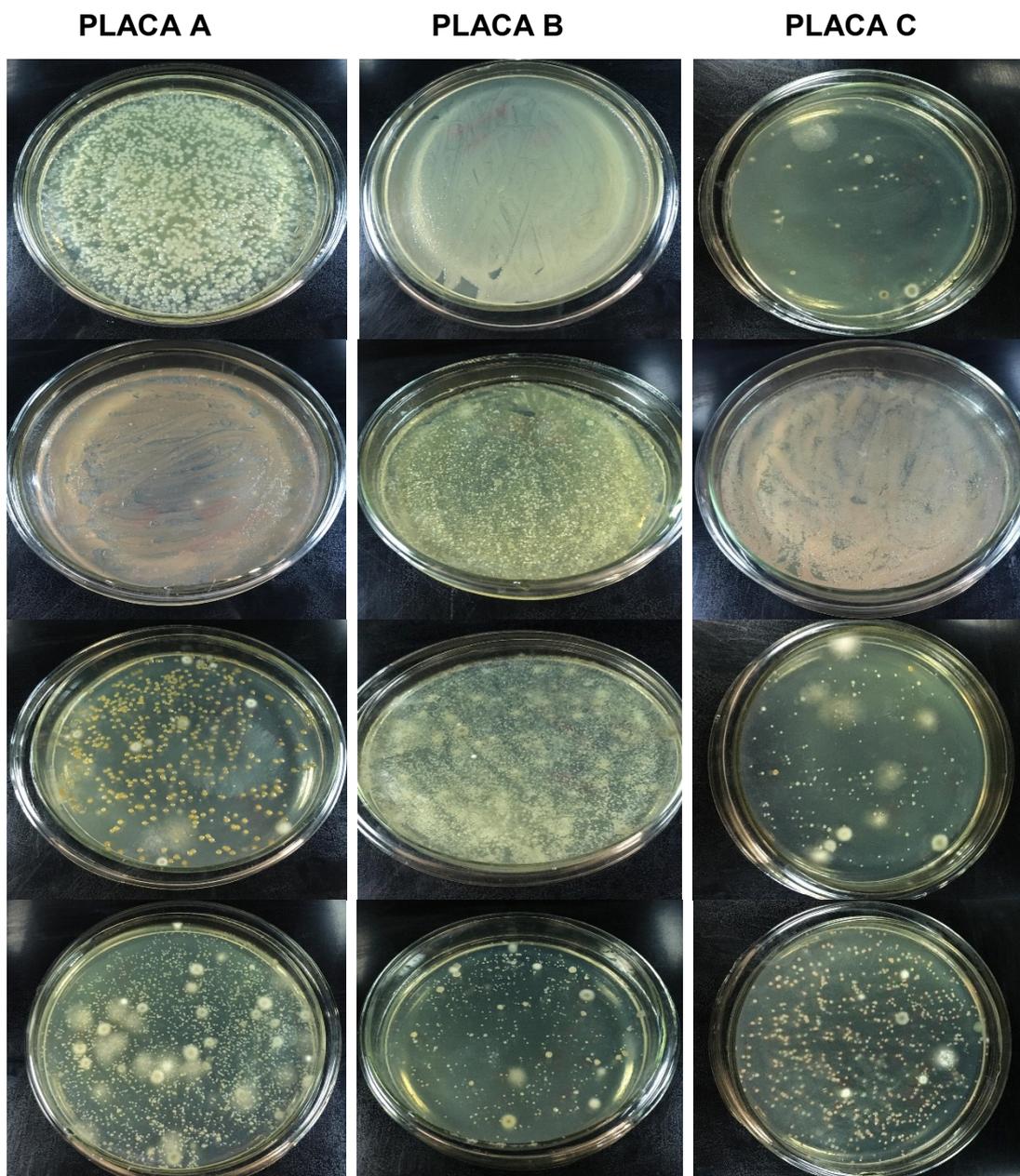
É importante ressaltar o quadro 9 que demonstrou um alto grau de resistência a Ampicilina, uma penicilina de amplo espectro extremamente utilizada no nosso cotidiano. Quando exposta a uma concentração recomendada pela comunidade científica como selecionadora de bactérias resistentes (HAUHNAR *et al.*, 2018), nota-se uma redução do número de colônias, bem como da sua variabilidade morfológica uma vez comparada as amostras puras.

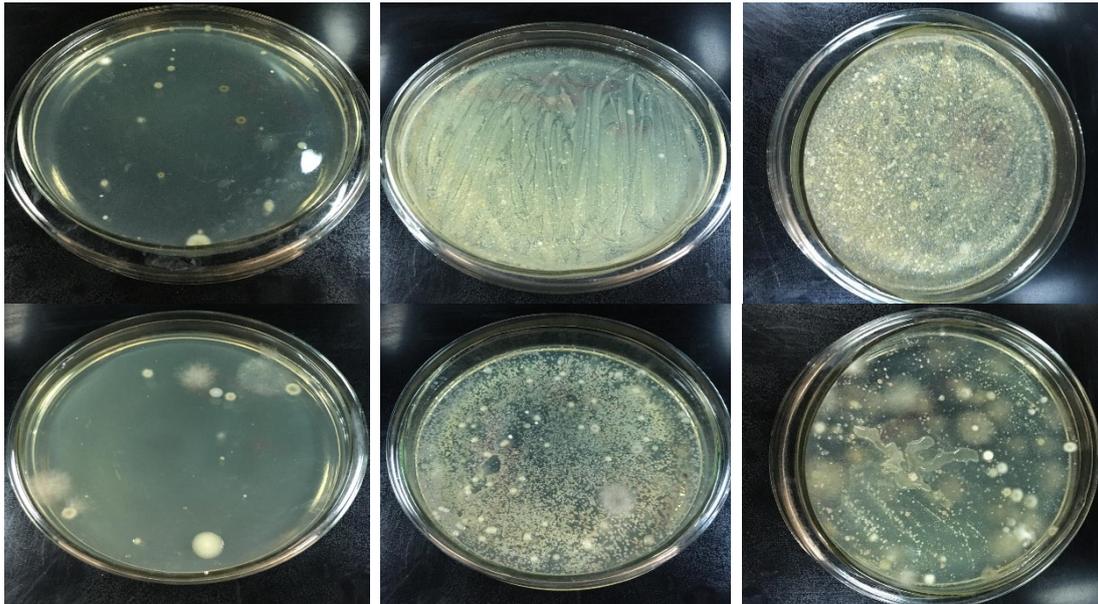
Em contrapartida, este número de bactérias resistentes ainda é muito elevado, tornando-o um fator preocupante, visto que a cada dia surgem novos microrganismos persistentes aos antibióticos, resistindo em condições assépticas. Em tempos de coronavírus, enxerga-se ainda mais a dificuldade de conhecimento e estudos mais aprofundados. Trabalho recente na Science denotou que qualquer organismo pode sofrer alterações genéticas e dar saltos evolutivos rápidos capazes de infectar outras espécies ou de se tornarem resistentes aos tratamentos conhecidos.

Segundo a ANVISA a ampicilina quando em associação com sulbactam é ativa contra cepas produtoras de beta-lactamases incluindo *S. aureus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E.coli*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Klebsiella spp.* e anaeróbios. Por outro lado, não possui atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* ou cepas de enterobacteriaceas indutoras de beta-lactamases. Já existem relatos de cepas de *E. coli* resistentes a esta associação, tal fato pode explicar o aparecimento de bactérias, mesmo estando expostas a este antibiótico. Além disso, manter as amostras na geladeira após a coleta pode atenuar a viabilidade de certas linhagens, tendo em vista que visualmente, observa-se uma diminuição dessas cepas. O quadro 9 demonstra as amostras de bactérias resistentes a Ampicilina na

concentração de 10µg/mL, as quais foram coletadas no banheiro da maternidade, obstetrícia, sala de urgência, posto da urgência, laboratório e pediatria, respectivamente.

Quadro 9: Amostras em triplicatas de bactérias expostas a Ampicilina na concentração de 10µg/mL.





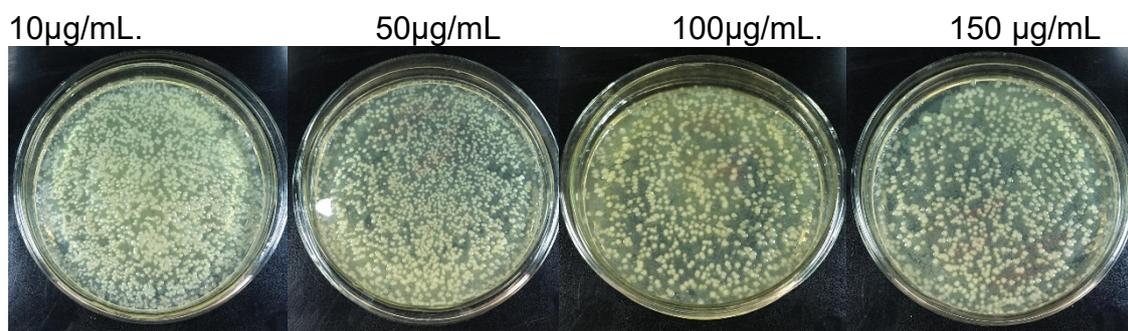
Fonte: autoria própria.

Da mesma forma, pode ser observado no quadro 10 ao analisar em destaque a amostra do sanitário do banheiro da maternidade exposta a Ampicilina em concentrações distintas, a qual apresenta uma resistência muito acentuada. De acordo com Pires (2007) as bactérias apresentam maior resistência a ampicilina, porém esse antibiótico ainda tem ação antimicrobiana e deve ser usado em casos que as bactérias são mais resistentes aos outros antibióticos ou quando o paciente possui sensibilidade aos outros medicamentos.

Nesse ponto de vista, testes futuros na nova vigência da pesquisa contemplarão outros antibióticos disponíveis pelo grupo de pesquisa como a higromicina, kanamicina, tetraciclina, penicilina e azitromicina.

Um novo estudo publicado na revista Science em 2016, trouxe demonstrações em larga escala de como uma bactéria reage a doses crescentes de antibióticos, o qual a cada nível de concentração da droga, um pequeno segmento das bactérias se adaptava às condições adversas, resultado de sucessivas mudanças genéticas (BAYM, 2016). Tal fato é semelhante com a amostra do sanitário, uma vez que ao se adaptar aquela determinada concentração, sendo ela mais alta ou não, a bactéria ainda consegue se proliferar e prosseguir com sua patogenicidade, como mostra no quadro 10.

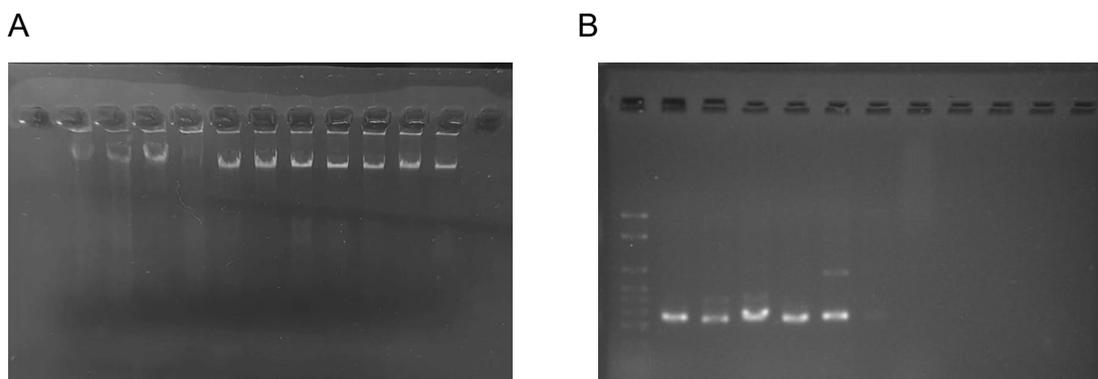
Quadro 10: Amostras de bactérias resistentes a Ampicilina em diferentes concentrações, coletadas no sanitário do banheiro da maternidade.



Fonte: autoria própria.

Esse conjunto de bactérias diferenciadas nos ambientes estudados denota a necessidade de conhecimento destes para futuras ações de controle mais efetivo de populações microbianas que podem ser responsáveis por acometimentos diversos em pacientes que frequentam este ambiente. Os protocolos de extração de DNA para posteriores análises filogenéticas já estão otimizados e em pleno funcionamento, isto é uma possibilidade adicional para a identificação dos microrganismos pontualmente por meio do gene 16S rDNA bacteriano. As figuras 1 e 2 demonstram protocolos de extração já em funcionamento para aplicação futura. Sabemos das dificuldades atuais devido a pandemia global instalada em realizar tanto procedimentos, quanto coletas e análises mais elaboradas devido à sobrecarga do sistema principalmente hospitalar e laboratorial. Contudo esse é um desafio que vamos encarar e tentar superar com segurança e eficácia.

Quadro 11: A: Extrações de DNAs de microrganismos isolados existentes em ambiente hospitalar pelo método CTAB; B: Amplificações do gene 16S para isolados de ambiente hospitalar.



Fonte: autoria própria.

De acordo com o quadro 11, apesar de algumas ampliações inespecíficas observadas percebe-se um bom desempenho na amplificação do gene 16S para bactérias hospitalares. O gene do RNA ribossômico 16S é o marcador mais utilizado na ecologia microbiana para análises de perfis populacionais do progresso molecular. Portanto, a distribuição das sequências desse gene em amostras diversas contribui para a classificação taxonômica e filogenética do ambiente.

CONCLUSÕES

Em síntese, apesar de toda a dificuldade e desafios impostos pela pandemia e também dos impasses ao acesso para realizar as atividades laboratoriais, conseguimos resultados satisfatórios para o projeto. A partir destes, conclui-se que há uma grande quantidade e diversidade de bactérias em ambientes hospitalares onde as pessoas estão mais frágeis e propensas a esses microrganismos, nessa conjuntura, estudos prospectivos e técnicas moleculares estão mostrando ser bastante promissores e eficazes no estudo da comunidade microbiana presentes nas amostras coletadas, bem como na resistência aos antibióticos. Além disso, observam-se fatores preocupantes no âmbito comunitário, uma vez que foram encontrados diversos gêneros e variadas espécies de bactérias, sendo estas possivelmente patogênicas e não patogênicas de um modo geral também resistente a Ampicilina. Nesse sentido, também se faz importante a preocupação com relação ao uso indiscriminado de antibióticos pela sociedade, uma vez que é clara a presença de microrganismos resistentes nos meios com os mais diversos medicamentos dessa classe farmacológica.

PERSPECTIVAS

Com a finalização desse projeto, outros trabalhos científicos e pesquisas tornaram alvos de estudos, o que nos deixa ainda mais engajados e envolvidos na área microbiológica. Assim como, a aprovação do projeto para identificação molecular dessas bactérias resistentes no Hospital Municipal de Cuité.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Desenvolvido a partir do programa PIBIC/CNPq-UFCG, com apoio da Universidade Federal de Campina

Grande campus Cuité-PB pela disponibilização do Laboratório H1, bem como o grupo de pesquisa o qual estou inserida, BASE – Biotecnologia Aplicada à Saúde e Educação.

REFERÊNCIAS

AMARAL, Luisa da Silva *et al.* **Principais fatores causais de infecções relacionadas à assistência à saúde em unidades de terapia intensiva: uma revisão integrativa.** 2020.

BAREA, Jaqueline A.; PARDINI, Maria Inês; GUSHIKEN, Tsieko. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BAYM, Michael *et al.* Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. **Science**, v. 353, n. 6304, p. 1147-1151, 2016.

BOADA, Albert *et al.* Previous antibiotic exposure and antibiotic resistance of commensal *Staphylococcus aureus* in Spanish primary care. **European Journal of General Practice**, v.24, n.1, p.125-130, 2018.

BUCKNER, Michelle MC; CIUSA, Maria Laura; PIDDOCK, Laura JV. Strategies to combat antimicrobial resistance: anti-plasmid and plasmid curing. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 6, p. 781-804, 2018.

DE FREITAS, Cristiane Güths da Silva *et al.* Prevalência de microrganismos em bandejas utilizadas pela enfermagem na administração de medicamentos em ambiente hospitalar. **REVISTA INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS–RICSB**, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2020.

DE QUEIROZ, Neusa de Santos. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, n. Esp, 2004.

FRACAROLLI, I. F. L. ; De Oliveira, S. A. ; Marziale, M. H. P. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 6, p. 651-657, 2017.

GUIMARAES, D.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova, São Paulo**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAUHNAR, Lalremruata *et al.* Isolation and Characterization of Multi-Drug Resistant Bacteria from Hospital Wastewater Sites around the City of Aizawl, Mizoram. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 9, n. 07, p. 311, 2018.

HOU, X.H.; Canção, X.Y.; Zhang, S.Y.; Zhang, J.Q. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.3, p. 59-768, 2015.

MOREIRA, Sofia Magalhães *et al.* Genomic and gene expression evidence of nonribosomal peptide and polyketide production among ruminal bacteria: a potential role in niche colonization?. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 2, p. fiz198, 2020.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

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

PIRES, Marcelle Cristina da Silva *et al.* Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 643-647, 2007.

RAFRAF, Ikbel Denden *et al.* Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. **Environmental pollution**, v.219, p.353-358, 2016.

RIBEIRO, K. **Mudança no uso do solo e emissões de gases de efeito estufa (GEE) em diferentes coberturas vegetais na caatinga brasileira.** 2017.

ROCHA, Maristela Yoshie Yamaji Okagawa *et al.* Conhecimento de enfermeiros de hospital universitário sobre bactérias multirresistentes. **Rev Rene (Online)**, p. e41281-e41281, 2019.

ROUSHAM, Emily *et al.* Spatial and temporal variation in the community prevalence of antibiotic resistance in Bangladesh: an integrated surveillance study protocol. **BMJ open**, v.8, n.4, 2018.

SELVARAJ, Ganesh-Kumar *et al.* Culture-based study on the development of antibiotic resistance in a biological wastewater system treating step wise increasing doses of streptomycin. **AMB Express**, v.8, n.1, p.12, 2018.

SILVA, Marliane de Cássia Soares *et al.* **Perfil da comunidade de bactérias e fungos em frutos de café localizados em diferentes altitudes e faces de exposição ao sol.** 2019.

VERA-GARGALLO, B.; Ventosa, A. Metagenomic insights into the phylogenetic and WU, Jiao *et al.* Evidences for environmental dissemination of antibiotic resistance mediated by wild birds. **Frontiers in microbiology**, v.9, p.745, 2018.

XIE, Ruiqiang *et al.* Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. **Emerging microbes & infections**, v.7, n.1, p.31, 2018.