

UNIVERSIDADE FRANCISCANA

CURSO DE BIOMEDICINA

THAÍS DA COSTA ORLANDO

**VIGILÂNCIA MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL DA RESISTÊNCIA A
CARBAPENÊMICOS EM UM HOSPITAL DE MÉDIO PORTE NA CIDADE DE
SANTA MARIA-RS**

SANTA MARIA- RS

2021

THAÍS DA COSTA ORLANDO

**VIGILÂNCIA MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL DA RESISTÊNCIA A
CARBAPENÊMICOS EM UM HOSPITAL DE MÉDIO PORTE NA CIDADE DE
SANTA MARIA-RS**

Trabalho final de graduação (TFG)
apresentado ao Curso de Biomedicina, Área
de Ciências da Saúde, da Universidade
Franciscana - UFN, como requisito para
aprovação na disciplina TFG II.

Orientador: Dr. Prof. Bruno Stefanello Vizzotto

Santa Maria- RS

2021

VIGILÂNCIA MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL DA RESISTÊNCIA A
CARBAPENÊMICOS EM UM HOSPITAL DE MÉDIO PORTE NA CIDADE DE
SANTA MARIA-RS

ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGICAL SURVEILLANCE OF CARBAPENEM
RESISTANCE IN A MEDIUM SIZED HOSPITAL IN THE CITY OF SANTA MARIA -
RS

Thaís da Costa Orlando; Eduarda de Oliveira Pinto; Julia Cavalli Lenz; Bruno Rodrigues
dos Santos; Maria Clara Colvero de Oliveira; Bruno Stefanello Vizzoto

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar o crescimento de bactérias com resistência à Carbapenemases em amostras provenientes de superfícies hospitalares para vigilância microbiológica ambiental de um hospital de médio porte na cidade de Santa Maria -RS. Métodos: Realizou-se um estudo experimental por cultivo bacteriano em meio seletivo e por biologia molecular com a técnica de PCR convencional. Resultado: O resultado do trabalho consistiu em um crescimento de importantes espécies patogênicas de bactérias coletadas de lugares ambientais diferentes, uma amostra positiva para o gene *blaKPC* e duas amostras positivas para o gene *blaNDM*. Considerações finais: Esse trabalho reafirma a importância de ações contínuas para contenção e monitoramento de disseminação bacteriana e a necessidade da existência de vigilância microbiológica periódica em hospitais.

PALAVRAS-CHAVE: IRAS; Biologia molecular; Vigilância hospitalar.

ABSTRACT

Objective: The objective of this work was to identify and analyze the growth of bacteria with resistance to carbapenemases in hospital surfaces for environmental microbiological surveillance of a medium-sized hospital in the city of Santa Maria -RS. Methods: An experimental study was carried out by bacterial culture in selective medium and by molecular biology using the conventional PCR technique. Result: The result of the work consisted of a

growth of pathogenic bacterial species collected from different environmental places, one sample positive for the blaKPC gene and two positive for the blaNDM gene. Final considerations: This work reaffirms the importance of actions to contain bacterial dissemination and the existence of periodic microbiological surveillance in hospitals.

KEYWORDS: IRAS; Molecular biology; Hospital surveillance.

INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a capacidade de um microrganismo em impedir a atuação de um antimicrobiano. O surgimento desse fenômeno está relacionado a diversos fatores como o uso indevido de agentes antimicrobianos, programas de controle de infecção e de gerenciamento da terapia antimicrobiana inadequados, entre outros. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o aumento da resistência antimicrobiana acarreta uma série de consequências aos cidadãos, como a permanência prolongada no ambiente hospitalar e a ineficácia dos tratamentos preventivos que prejudicam toda a população^{1,2}.

Algumas espécies conhecidas que apresentam resistência a antimicrobianos são pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem) possuem atividade *in vitro* de amplo espectro e são recomendados como terapia empírica contra bactérias, especialmente bacilos gram-negativas (BGN), causadoras de grande variedade de infecções de origem comunitária e infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), tais como infecções respiratórias, urinárias e da corrente sanguínea³.

Atualmente, as *Enterobacterales* produtores de Carbapenemase (EPCs) de classes A (serino-carbapenemases), B (metallo-carbapenemases) e D (oxacilinases) de maior importância epidemiológica e clínica são as dos tipos KPC, NDM e OXA-48, respectivamente, sendo que os determinantes genéticos dessas enzimas estão localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, aumentando sua transmissibilidade horizontal e disseminação. Apesar dessas resistências serem comumente encontradas em *Klebsiella spp.*, estão também presentes em vários outros BGN, incluindo *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella spp.* Além disso, também já foram relatadas em organismos lactose negativos, especialmente em *Pseudomonas aeruginosa*^{4,5}.

A enzima KPC (K. pneumoniae carbapenemase), pertencente ao grupo A, foi relatada pela primeira vez em 1996 em uma cepa de *K. pneumoniae* recuperada de paciente na Carolina do Norte (EUA). Esta enzima tem a capacidade de hidrolisar os beta-lactâmicos de todas as classes e são codificadas por genes *bla*. A grande capacidade de disseminação do

gene *blaKPC* está relacionada a sua capacidade de associação com elementos genéticos móveis, principalmente o transposon Tn44011⁶.

A enzima NDM (New Delhi metalo- β -lactamase), pertencente ao grupo B, foi descrito pela primeira vez em um paciente internado em um hospital na Índia, em 2009. Desde então, bactérias produtoras de NDM foram identificadas em mais de 40 países⁷. O gene *blaNDM*, diferentemente do que tem sido observado para o gene *blaKPC*, não se encontra relacionado a propagação de clones ou complexos clonais específicos, plasmídeos específicos ou estruturas genéticas únicas. A enzima NDM hidrolisa uma ampla gama de betalactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenemases⁸. Já a enzima OXA-48, incluso no grupo D, foi descrita pela primeira vez na Turquia em 2004 e, em seguida, rapidamente disseminado em vários países europeus. O gene *blaOXA-48* já foi identificado em plasmídeos, associado a duas cópias da sequência de inserção IS1999, estrutura denominada Tn1999⁹.

Segundo Bordignon & Lima (2017)¹⁰, há inúmeras causas de IRAS, sendo as mais comuns em consequência de falhas no processo de assistência hospitalar, como na higienização tanto do profissional quanto do paciente, mas também pode ocorrer por falha na esterilização e manuseio de medicações, objetos e instrumentos cirúrgicos, e na execução de procedimentos invasivos, a suscetibilidade à infecção aumenta. Além disso, devido à vulnerabilidade imunológica de alguns pacientes, as infecções podem ter origem de bactérias e fungos da própria microbiota.

Dessa forma, o monitoramento microbiano do ambiente hospitalar serve para além de identificar patógenos multirresistentes que podem ser a causa de um surto, também para avaliar a eficácia da limpeza de rotina e de práticas de desinfecção. Atualmente, na maioria das instituições de saúde, as avaliações de higiene são realizadas esporadicamente, geralmente após o início de um surto, em vez de uma avaliação contínua. Investigações epidemiológicas na disseminação de patógenos nosocomiais durante surtos incluem superfícies diversas, como torneiras, pias e vasos sanitários. Estudos *in vitro* estabeleceram que muitos patógenos nosocomiais relevantes podem sobreviver em superfícies inanimadas por semanas^{11,12}.

Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo verificar a incidência de bactérias resistentes a carbapenêmicos, por meio de cultura microbiana e da biologia molecular, de amostras de superfícies ambientais de um hospital de médio porte na cidade de Santa Maria -RS.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises de vigilância ambiental foram realizadas nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Franciscana – UFN, onde as amostras coletadas (swabs) foram processadas e os microrganismos identificados armazenados em caldo BHI + Glicerol 15% à -80°C para análises moleculares.

As amostras foram coletadas pela utilização de 01 swab de algodão estéril umidificado por área selecionada, aplicando fricção nas superfícies em ângulo de 30°, rotacionando o swab e rolando o mesmo em todas as direções (vertical, horizontal e diagonal) durante 10 segundos em uma área de aproximadamente 25 cm², a partir dos ambientes hospitalares mais comumente utilizados. Antes da passagem do swab nas superfícies, o mesmo foi pressionado contra a lateral do tubo de coleta a fim de padronizar o volume de líquido de umidificação utilizado em cada swab¹³.

Após todas as amostras serem coletadas, os swabs foram acondicionados em tubos falcon de 15mL contendo 5mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) adicionado de polissorbato (Tween) 80 (0.02%) como agente neutralizante de resíduos de desinfetantes utilizados na rotina hospitalar, como compostos de amônio quaternário, peróxido de hidrogênio, fenóis e hipoclorito de sódio os quais possam inibir o crescimento da microbiota ambiental e/ou as identificações subsequentes¹³. Os tubos contendo caldo TSB foram transportados até o Laboratório de Microbiologia da Universidade Franciscana (UFN) dentro de 4h após a coleta a uma temperatura de 4 – 8 °C, em caixas de isopor contendo gelo de transporte.

Após a chegada das amostras ao laboratório, inicialmente as mesmas sofreram um processo de dissociação mecânica utilizando o vórtex por 30 segundos, com vistas a separar os agregados bacterianos nas fibras do swab. Então, foram incubadas por 24h a 35 ± 2 °C sob condições aeróbicas em estufa bacteriológica para realização do pré-enriquecimento celular. Transcorrido este tempo, alíquotas de 10 uL de cada amostra foram semeadas em

placas de petri contendo Ágar KPC Cromogênico (LABORCLIN®). As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C sob condições aeróbicas em estufa bacteriológica e o crescimento examinado por 48h.

Transcorrido o tempo de incubação, o crescimento bacteriano nas placas foi examinado, conforme a bula do fabricante: colônias com cores rósea, magenta ou avermelhado, indicam *E. coli*; colônias com cores verde escura a azul metálico, presume-se grupo KESC (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* ou *Citrobacter spp.*); colônias com cores cinza a creme, sugerem *Pseudomonas spp.*; colônias com cores amarelo a marrom ou verde com halo marrom, apontam *Proteus ssp.*, *Morganella ssp.*, *Providencia ssp.* Os microrganismos que apresentaram crescimento no meio de cultura seletivo foram caracterizados molecularmente para confirmação do mecanismo de resistência, de acordo com Bastiaens et al., 2020¹⁴.

Para a extração do material genético das bactérias, de três a quatro colônias isoladas foram alçadas e colocadas em microtubos contendo 2 mL de salina estéril, adicionou-se as colônias bacterianas, segundo a escala 0,5 de turbidez de McFarland. Após, as amostras foram incubadas a 100°C durante 10 minutos. Por fim, foram centrifugadas a 9.800 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes contendo o DNA foram transferidos para novos microtubos.

Após a extração, os ensaios de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) convencional foram realizados com primers para o *blaKPC*, KPC-F (5'-ATGTCACTGTATCGCCGTCT-3') e KPC-R (5'-TTTTTCAGAGCCTTACTGCC-3'), como descrito anteriormente Schechner (2009)¹⁵, com 983 pares de bases. A PCR foi realizada em termociclador PROFLEX™ PCR SYSTEM (Thermo Fisher Scientific®) com Master Mix DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda®), contendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 2,5 U de Taq Polimerase, 0,63 µl de cada primer e 2 µl de DNA bacteriano para um volume final de 25 µl. A amplificação da reação foi realizada usando as seguintes condições: 95°C por 15 minutos na desnaturação inicial, seguido por 38 ciclos de 94°C por 01 minuto, 54°C por 01 minuto e 72°C por 01 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os ensaios realizados com primers para o *blaNDM*, NDM-F (5'-TTGGCCTTGCTGTCCTTG-3') e NDM-R (5'-ACACCAGTGACAATATCACCG-3'), como descrito anteriormente Monteiro (2012)¹⁶, com 82 pares de bases. A PCR também foi

realizada em termociclador PROFLEX™ PCR SYSTEM (Thermo Fisher Scientific®) com Master Mix DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda®), contendo 0,25 mM dNTP, 2,5 U de Taq Polimerase, 0,625 µl de cada primer e 2 µl de DNA bacteriano para um volume final de 25 µl. A amplificação da reação foi realizada usando as seguintes condições: 95°C por 05 minutos na desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e uma etapa de extensão final a 72°C por 05 minutos.

Para verificar a eficiência do PCR e determinar os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados, cada produto de reação foi analisada por eletroforese em 2% (peso / vol) para *bla*NDM e 1% para *bla*KPC de gel de agarose. Para ambas as reações foi utilizado Gel Red com bromofenol - Loading Buffer DNA 5x. Após a eletroforese, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta (UV) a 260 nm.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Institucional (CEP-UFN) sob número CAAE: 53176421.9.0000.5306.

RESULTADOS

Nesse trabalho, foram coletadas 110 amostras de superfícies hospitalares, incluindo bandejas de medicação, bacias de banho, leitos, carrinhos de anestesia, respiradores, mesas, bancadas e pias. Destas, em 31 (28,18%) placas de petri houve crescimento bacteriano em meio Ágar KPC Cromogênico (LABORCLIN®), em algumas placas obtivemos mais de um crescimento bacteriano, totalizando 44 bactérias provenientes de diversos sítios de coletas. Por meio das características das colônias, foram identificados 39,02% pertencentes ao grupo KESC, 34,14% *Pseudomonas spp.* e 21,95% *E. coli*, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Demonstrativo sobre locais de coleta e as bactérias identificadas a partir do crescimento no Ágar Cromogênico KPC e pela metodologia de PCR.

Isolado	Identificação	n (%)	Mecanismo molecular	Local de isolamento
HCSCARBA21	Grupo KESC	39	<i>bla</i> NDM	UPA 24h

HCSCARBA4	<i>Pseudomonas spp.</i>	34,1	<i>blaKPC</i> ,	Unidade Santa Isabel
HCSCARBA5	<i>Pseudomonas spp.</i>		<i>blaNDM</i>	

Fonte: Autora, 2021.

Após análise fenotípica, o teste molecular foi realizado em todos os crescimentos bacterianos por meio da PCR convencional. Como resultado, obtivemos 01 (2,27%) amostra positiva para o gene *blaKPC* e 02 (4,54%) amostras positivas para o gene *blaNDM*, como exposto na Figura 1.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com primers específicos para os genes *blaKPC* e *blaNDM*.

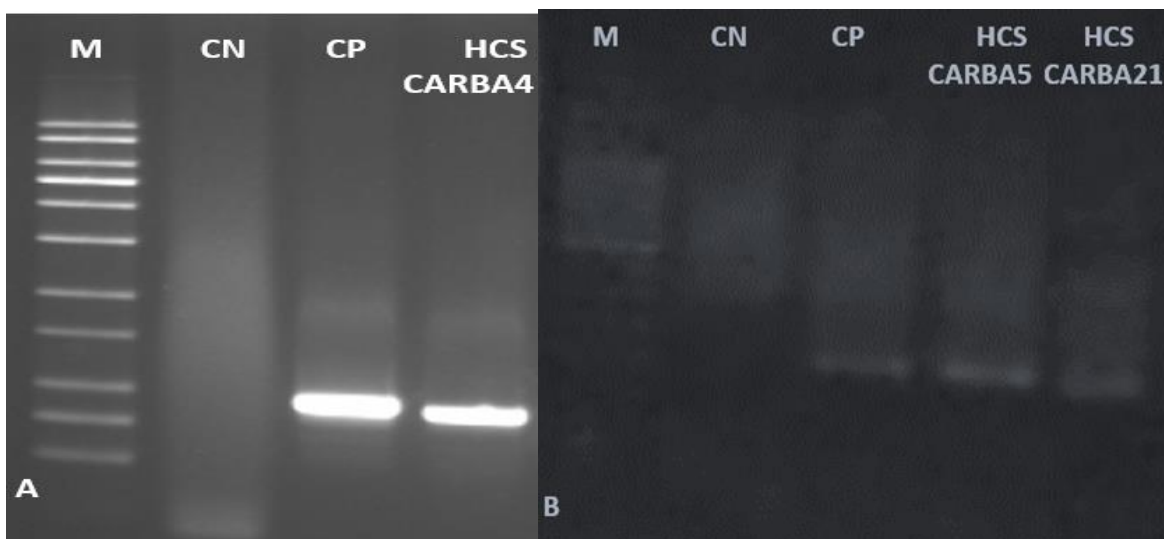


Imagem A: Marcador (M) de 100 pares de bases (pb) / controle negativo (CN) / controle positivo (CP) para *blaKPC* / amostra positiva. **Imagem B:** Marcador de 50 pb controle negativo / controle positivo para *blaNDM* / amostras positivas para *blaNDM*.

DISCUSSÃO

O Ágar Cromogênico KPC (LABORCLIN®) tem como princípio a inibição da microbiota contaminante e a capacidade de isolar espécies EPC's por conter em sua formulação cromógenos específicos para espécies de *Enterobacteriaceae*, dentre os constituintes, o meropenem está presente.

A *Pseudomonas spp.* é responsável por uma relevância significativa das infecções nosocomiais, com tendência em adquirir resistência aos antibióticos, particularmente aqueles

em unidade de terapia intensiva (UTI). Em nossa pesquisa, encontramos 34,14% de *Pseudomonas spp.* resistentes a meropenem. O estudo de GAD et al (2007)¹⁷ demonstrou que *P. aeruginosa* isoladas de superfícies de hospitais são mais prováveis de serem resistentes a carbapenemases em comparação com isolados de amostras clínicas.

Na tabela 1, demonstramos que encontramos muitos BGN em ambientes hospitalares, como *Pseudomonas spp.* em bandejas e quarto de isolamento, *E.coli* em pias e leitos, e grupo KESC em maçanetas, pias e em carrinho de anestesia. Assim como Galvin e colaboradores (2012)¹⁹ encontraram muitos tipos de microrganismos patogênicos em uma variedade de superfícies hospitalares comuns, incluindo *K. pneumoniae* (estrutura da cama, mesa sobre a cama, colchas, ralos, pias) e *A. baumannii* (grades da cama, pias, mesas, cortinas e portas). Outro estudo demonstrou que pacientes internados em uma sala anteriormente ocupada por um paciente com bactérias resistentes têm até 70% mais chances de adquirir esses patógenos durante sua internação¹⁸.

As técnicas moleculares, além da área diagnóstica, também podem ser aplicadas para fomentar dados que contribuem para informações epidemiológicas, incluindo a vigilância de doenças e investigação de surtos²⁰. A PCR é uma técnica com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade, permite a análise de variados números de amostras simultaneamente e é considerado padrão-ouro para identificação e rastreamento de genes de resistência expressos por bactérias. A grande vantagem da biologia molecular é sua alta sensibilidade que permite a detecção do patógeno em pequena quantidade na amostra²¹. Dessa maneira, a detecção molecular de bactérias com genes resistentes provenientes de ambientes hospitalares é de suma importância para o controle de vigilância hospitalar.

Em nosso estudo, encontramos dos genes *blaNDM* e *blaKPC* em bactérias de diversas espécies e em locais de coletas diferentes. O estudo de Wink et al. (2020)²², corrobora com nossos resultados, que demonstra um aumento significativo na frequência do *blaNDM*, de 4,2% em 2015 para 24% em 2020, em amostras de um hospital de Porto Alegre. Esse estudo também apresenta o contrário, foi possível observar, uma tendência de diminuição da frequência do tipo *blaKPC* de 90% em 2015 para 77% em 2020.

Além de adquirir genes com capacidade de degradar ligações químicas de antibióticos, os microrganismos utilizam outras estratégias para aumentar a resistência

intrínseca aos antibióticos, como variação da permeabilidade da membrana celular e alteração do efluxo de drogas²³. As bombas efluxo transportam ativamente pequenas moléculas para fora da célula bacteriana, algumas bombas são conhecidas por remover vários substratos, tornando esses fatores os principais contribuintes para resistência a múltiplas drogas²⁴.

Já a modificação da permeabilidade do antibiótico pode ser causada por alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas, por onde penetram os antibióticos. Assim, a diminuição na função ou na quantidade de porinas causa a resistência da bactéria ao antibiótico, baixando o nível de antibiótico no interior da célula^{25,26}. Esses outros mecanismos de resistência podem justificar o crescimento bacteriano com resistência ao meropenem em Ágar KPC Cromogênico (LABORCLIN®), sem a confirmação pela biologia molecular dos genes *blaKPC* e *blaNDM*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo revelaram uma expressiva quantidade de crescimento bacteriano com resistência a carbapenêmicos em amostras de superfícies hospitalar, de modo que três positivas para os importantes genes *blaKPC* e *blaNDM*. Assim, é essencial a reiteração das medidas preventivas de higienização dos ambientes hospitalares, bem como dos profissionais e pacientes.

REFERÊNCIAS

1. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS (*World Health Organization - WHO*). Ten threats to global health in 2019. Disponível em < <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>>. Acesso em 15 novembro 2021.
2. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Diretriz+Nacional+para+Elabora%C3%A7%C3%A3o+de+Programa+de+Gerenciamento+do+Uso+de+Antimicrobianos+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde/667979c2-7edc-411b-a7e0-49a6448880d4>> Acesso em 20 outubro 2021.
3. Salmon-Rousseau A, Martins C, Blot M, Buisson M, Mahy S, Chavanet P, et al. Comparative review of imipenem/cilastatin versus meropenem. *Med Mal Infect* [Internet]. 2020;50(4):316–22. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.01.001>
4. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* [Internet]. 2011;19(12):588–95. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005>

5. De Paula VG, Quintanilha LV, E Silva F de AC, Da Rocha HF, Dos Santos FL. Enterobactérias produtoras de carbapenemase: reflexão sobre o surgimento de superbactérias em UTI's. Univ Ciências da Saúde. 2016; Disponível em: <https://doi.org/10.5102/ucs.v14i2.3847>
6. Buckner MMC, Saw HTH, Osagie RN, McNally A, Ricci V, Wand ME, et al. Clinically relevant plasmid-host interactions indicate that transcriptional and not genomic modifications ameliorate fitness costs of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-carrying plasmids. MBio. 2018; Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02303-17>
7. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. BMC Microbiol. 2017;17(1):1–12; Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8>
8. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria. Biomed Res Int. 2014;2014; Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/249856>
9. Pereira S, Polyana et al. Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. 2016; Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/17790/2/polyana_pereira_ioc_dout_2016.pdf
10. Bordignon JC, Lima LR de. Etiologia de infecções hospitalares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital do sudoeste do Paraná, Brasil. Rev Bras Análises Clínicas. 2017;49(3):283–8. Disponível em: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201700566>
11. Coughenour C, Stevens V, Stetzenbach LD. An evaluation of methicillin-resistant staphylococcus aureus survival on five environmental surfaces. Microb Drug Resist. 2011;17(3):457–61. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0007>
12. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect Dis. 2006;6:1–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>
13. Chai J, Donnelly T, Wong T, Bryce E. Environmental sampling of hospital surfaces: Assessing methodological quality. Can J Infect Control. 2018;33(3):138–45. Disponível em: <https://ipac-canada.org/photos/custom/pdf/cjicArticleBryce.pdf>
14. Bastiaens GJH, Baarslag T, Pelgrum C, Mascini EM. Active surveillance for highly resistant microorganisms in patients with prolonged hospitalization. Antimicrob Resist Infect Control. 2020;9(1):1–4. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0670-8>
15. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, et al. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the Enterobacteriaceae family. J Clin Microbiol. 2009;47(10):3261–5. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.02368-08>
16. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):906–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>
17. Gad GF, El-Domany RA, Zaki S, Ashour HM. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: Prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. J Antimicrob Chemother. 2007;60(5):1010–7. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm348>

18. Nseir S, Blazejewski C, Lubret R, Wallet F, Courcol R, Durocher A. Risk of acquiring multidrug-resistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2011;17(8):1201–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03420.x>
19. Galvin S, Dolan A, Cahill O, Daniels S, Humphreys H. Microbial monitoring of the hospital environment: why and how? *J Hosp Infect* [Internet]. 2012;82(3):143–51. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2012.06.015>
20. Arend LN, Pilonetto M, de Alencar Siebra C, Tuon FF. Phenotypic and molecular characterization of 942 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in southern Brazil. *J Infect Chemother* [Internet]. 2015;21(4):316–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2014.11.011>
21. Da Silva RM, Traebert J, Galato D. Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing Klebsiella pneumoniae: A review of epidemiological and clinical aspects. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(6):663–71. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.681369>
22. Wink PL, Martins AS, Volpato F, Zavascki AP, Barth AL. Increased frequency of bla_{NDM} in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Brazilian J Microbiol*. 2021;52(1):299–301. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00412-z>
23. Munita JM, Arias CA. *Microbiology Spectrum*. Mech Antibiot Resist. 2016; Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
24. Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM. Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. *Chemical Reviews*. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00283>
25. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
26. Wang Y, Sun X, Kong F, Xia L, Deng X, Wang D, et al. Specific NDM-1 inhibitor of isoliquiritin enhances the activity of meropenem against NDM-1-positive Enterobacteriaceae in vitro. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph17062162>

NORMAS DE FORMATAÇÃO – REVISTA SAÚDE (SANTA MARIA)

1. Página de título

- Título completo: deve constar título completo (no idioma português e em inglês) ou para manuscrito em inglês (no idioma inglês e em português) ou para manuscrito em espanhol (no idioma espanhol e em inglês). **(máximo 50 palavras)**.

2. Resumo:

- Conter as principais partes do trabalho e ressaltando os dados mais significativos, em português e inglês (ou em outros idiomas como no título). **Para os artigos originais**, devem ser estruturados: Objetivo, Métodos, Resultados e Considerações Finais. **Para os artigos das demais seções**: não deve ser estruturado. **(máximo 300 palavras)**.

3. Descritores:

- a) Devem ser fornecidos no **mínimo três e máximo cinco termos** em português e inglês (ou em outros idiomas como no título).
- b) Os descritores devem ser baseados nos **Descritores em Ciências da Saúde (DeCS)** publicado pela Bireme, que é uma tradução do *Medical Subject Headings* (MeSH), da *National Library of Medicine*, e está disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.

4. Apresentação do texto:

- a) Devem ser submetidos em arquivo Word®.
- b) Corpo do texto: apresentado em folha A4, com fonte Times New Roman, tamanho 12, possuir espaçamento 1,5 (entrelinhas).
- c) Deverá ser iniciado pela introdução e apresentado de maneira contínua, sem novas páginas para cada subtítulo.
- d) As imagens e tabelas devem estar contidas no texto.
- e) Para qualquer dúvida: seguir normas Vancouver.

5. Tabelas:

- a) Devem ser numeradas consecutivamente e inseridas após sua citação no texto (não deve vir em arquivo separado).
- b) Dever conter um título conciso, porém explicativo.
- c) Conteúdo em fonte 12 com espaçamento simples.
- d) Não usar linhas horizontais ou verticais internas.
- e) Colocar no rodapé da tabela notas explicativas, quando necessária e legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados.
- f) **(no máximo quatro).**

6. Imagens:

- a) Todas as figuras (desenhos, gráficos, fotografias e quadros) devem estar citadas no texto e ser submetidas no tamanho exato ou acima do pretendido para a publicação.
- b) A numeração deve ser sequencial na ordem em que foram citadas no texto.
- c) Se as figuras já tiverem sido publicadas, deverão vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor, constando, na legenda da ilustração, a fonte original de publicação.
- d) **(no máximo quatro).**

7. Citações:

- a) As citações devem ser numeradas de forma consecutiva, na medida em que ocorrerem no texto.
- b) As citações devem ser realizadas utilizando numeração arábica, sobrescrita, em ordem numérica crescente, com vírgula (Exemplo: Enfermagem^{1,2,3})

8. Referências:

- a) A quantidade de referências deve estar de acordo com a categoria do manuscrito.
- b) As referências listadas serão normatizadas de acordo com o "Estilo Vancouver", norma elaborada pelo International Committee of Medical Journals Editors (<http://www.icmje.org>).

- c) Os títulos de periódicos devem ser referidos abreviados de acordo com o estilo apresentado pela *List of Journals Indexed in Index Medicus*, da *National Library of Medicine* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).
- d) Quando o documento possui de um até seis autores, citar todos os autores, separados por vírgula; quando possui mais de seis autores, citar todos os seis primeiros autores seguidos da expressão latina “et al.”.
- e) Para abreviatura dos títulos de periódicos nacionais e latino-americanos, consultar o site: <http://portal.revistas.bvs.br> eliminando os pontos da abreviatura, com exceção do último ponto para separar do ano. Ao citar as referências, tenha cuidado, para evitar o erro no nome dos autores, na citação do periódico, ano, volume e no número de páginas. Para tanto, recomenda-se o uso do DOI.
- f) A apresentação das referências listadas deverá ser em espaço simples, sem parágrafos, sem recuos e ordenadas numericamente de acordo com a ordem apresentada no texto.
- g) As referências devem estar atualizadas e não mais de 10 anos.