



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE - CAMPUS ANÍSIO TEIXEIRA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

NÍVEA NARA NOVAIS ANDRADE

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E PATOGENICIDADE
DE ESPÉCIES DE *Klebsiella* spp EM AMOSTRAS DE DOADORAS DO BANCO DE
LEITE HUMANO DO HOSPITAL MUNICIPAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA
CONQUISTA (BA).**

Vitória da Conquista – BA

2019

NÍVEA NARA NOVAIS ANDRADE

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E
PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Klebsiella* spp. EM AMOSTRAS
DE DOADORAS DO BANCO DE LEITE HUMANO DO HOSPITAL
MUNICIPAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA (BA).**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências, como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Biociências.

Orientador: Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira
Universidade Federal da Bahia

NÍVEA NARA NOVAIS ANDRADE

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E
PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Klebsiella* spp. EM AMOSTRAS DE
DOADORAS DO BANCO DE LEITE HUMANO DO HOSPITAL MUNICIPAL
ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA (BA).**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e
aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências,
Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 31 de maio de 2019.

Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Cláudio Lima Souza
Universidade Federal da Bahia

À minha mãe, Júlia, por todo o amor, suporte e colo nesse e em todos os momentos da minha vida e ao meu esposo, Caco, por abraçar meus sonhos e vivê-los comigo diariamente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço com a minha vida à Jesus Cristo, por me amar e me permitir viver meus sonhos, aos meus pais, Júlia e Beto, que são minha fonte de amor e força e aos meus irmãos, Flávia e Gustavo, que dividem todas as jornadas comigo: Amo vocês todos os dias e para sempre.

Minha gratidão eterna ao meu companheiro de vida, Caco, que abraça todas as minhas ideias malucas como se fossem dele e participou diariamente e intensamente de mais esse capítulo da minha vida. Obrigada pela paciência, suporte, companhia, caronas, abraços, conselhos e por acreditar em mim. No fim das contas, você merece receber esse título junto comigo.

Agradeço ao meu orientador, professor Márcio Vasconcelos, pela confiança, disponibilidade, parceria, compreensão e por ser um profissional admirável em quem me espelho sempre.

Estendo meus agradecimentos a todos os mestres do IMS/CAT-UFBA, que são referências na construção de quem eu quero ser, em especial aos professores Cláudio Lima e Lucas Marques, que me auxiliaram sempre que precisei e fizeram parte de toda a minha trajetória acadêmica e da construção desse trabalho.

Eu jamais conseguiria concluir essa etapa se não houvesse colaboração de minha chefe e grande amiga Risolene Pessoa e toda a equipe do Laboratório Policlínica Vida. Cresci e me tornei uma pessoa muito melhor fazendo parte dessa família, palavras não conseguem expressar minha eterna gratidão por tudo que fazem por mim.

Aos meus grandes amigos de vida e meus familiares obrigada por compreenderem minhas ausências e me aceitarem falando o tempo inteiro desse mestrado nos últimos dois anos. A Dani, minha eterna terapeuta, obrigada por me ouvir e me fazer voltar a acreditar que eu poderia chegar até aqui.

Aos grandes amigos que fiz no mestrado Biociências: Que bom que nossos caminhos se cruzaram e foi possível dividirmos sorrisos e lágrimas. Meus agradecimentos especiais a Fabrícia e Luana, companheiras de projeto; a Lucas Coelho que se tornou um grande amigo no final dessa jornada e a Thiago por toda parceria e por ter

abraçado minha pesquisa e me auxiliado de todas as formas possíveis. Com vocês aprendi que pesquisa científica precisa ser feita com muito altruísmo e empatia.

Agradeço também a toda a equipe Banco de Leite Humano do Hospital Esau Matos e a todas as doadoras que aceitaram me receber em suas residências para a realização dessa pesquisa. Obrigada por construírem esse projeto comigo e por realizarem um gesto tão bonito de amor ao próximo através da doação de leite materno.

“Faça todo o bem que puder, de todas as maneiras que puder, de todas as formas que puder, em todos os lugares que puder, em todos os momentos que puder, a todas as pessoas que puder, sempre que puder”.

John Wesley

RESUMO

Os Bancos de Leite Humano (BLHs) são uma estratégia para garantir a nutrição de recém-nascidos (RNs) que não podem obter o leite humano (LH) através da amamentação direta. A coleta do leite humano ordenhado (LHO) é realizada por doadoras e pode ser feita em domicílio. As condições higiênico-sanitárias utilizadas devem seguir protocolos para evitar a contaminação microbiológica. Dentre as bactérias que podem contaminar o LHO destacam-se espécies de *Klebsiella* spp por serem importantes causadores de infecções neonatais como meningite, pneumonia e seps. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar a patogenicidade e perfil de resistência à antibióticos de isolados de *Klebsiella* spp. em amostras de doadoras provenientes do BLH em Vitória da Conquista e correlacionar a presença microbiana com as condições higiênico-sanitárias das participantes do estudo. Foram coletadas amostras de 30 doadoras cadastradas no BLH. Foram encontradas espécies de *Klebsiella* em 36,6% (n=11). Dessas, em 36,6% (n=4) o micro-organismo foi isolado apenas nas amostras cutâneas, 27,3% (n=3) apenas no leite humano ordenhado cru (LHOC), 18,2% (n=2) com resultados positivos nas amostras cutâneas e de LHOC e 9,1% (n=1) com crescimento em amostras cutâneas, LHOC e leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP). Através de detecção do gene *pehB* por PCR 73,4% (n=11) foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae*. Foi realizado o antibiograma com recomendação do CLSI 2017 em todas as cepas: 42,8% (n=6) apresentaram resistência a Ampicilina e Sulbactam e 35,7% (n=5) a Amoxicilina e Ácido Clavulânico. Os isolados também foram submetidos ao teste de detecção fenotípica de ESBL por disco-aproximação, 23,1% (n=3) apresentaram resultados positivos. Para o teste de Hodge modificado todas as cepas foram negativas. Foi utilizada a técnica qPCR para detecção de genes de ESBL: SHV-1, TEM, CTXM-1 e CTXM-2 e os genes de virulência *rmpA* e *wcaG*. 40,0% (n=6) apresentaram o gene *rmpA*, 41,6% (n=5) apresentaram o gene *wcaG*. Nenhuma cepa apresentou o gene CTXM-2, 41,6% (n=5) apresentaram o gene SHV-1, 41,6% (n=5) apresentaram o gene CTXM-1 e 53,3% (n=8) apresentaram o gene TEM.

ABSTRACT

Human Milk Banks (HMBs) is a strategy to ensure newborns nutrition who can not get human milk (HM) through direct breastfeeding. The collection of expressed human milk (EHM) is held by donor and can be done at home. The sanitary conditions must follow protocols used to prevent microbiological contamination. Among the bacteria that can contaminate the EHM stand out species of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp to be important causes of neonatal infections such as meningitis, pneumonia and sepsis. Thus, this study aimed to identify and characterize the pathogenicity and resistance antibiotics profile of the isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.in samples from donors from the HMB in Vitória da Conquista and to correlate the microbial presence with the hygienic-sanitary conditions of the study participants. Samples were collected from 30 registered donors at the BLH. No *E. coli* strains were isolated. *Klebsiella* species were found in 36.6% (n = 11). Of these, 36.6% (n = 4) micro-organism was isolated only in skin samples, 27.3% (n = 3) only in human milk raw, 18.2% (n = 2) with positive results in skin samples and human milk raw, and 9.1% (n = 1) an increase in skin samples, human milk raw and pasteurized human milk. Through detection of the gene *pehB* by PCR 73.4% (n = 11) were identified as *Klebsiella pneumoniae*. Was performed antibiogram with the recommendation of the CLSI 2017 and: 42, 8% (n = 6) were resistant to ampicillin and sulbactam and 35.7% (n = 5) to amoxicillin and clavulanic acid. The isolates were also submitted to testing phenotypic detection of ESBL-disk approach, 23.1% (n = 3) were positive. For Hodge test modified all strains were negative. qPCR was used for detection of ESBL genes: SHV-1, TEM-1, CTXM-1 and CTXM-2 and the virulence genes *rmpA* and *wcaG*.. 40.0% (n = 6) showed the *rmpA* gene, 41.6% (n = 5) had the *wcaG* gene. No strain showed the CTXM-2 gene, 41.6% (n = 5) had the SHV-1 gene, 41.6% (n = 5) had the CTXM-1 gene and 53.3% (n = 8) showed TEM gene.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. Banco de Leite Humano: Disposições Gerais	17
2.2. Seleção de doadoras	19
2.3. Coleta de LHO	19
2.4. Acondicionamento e armazenamento do LHOC	20
2.5. Transporte do LHO	21
2.6. Recebimento e estocagem no BLH	21
2.7. Degelo, seleção e classificação do LHOC	22
2.8. Reenvase do LHOC	22
2.9. Pasteurização do LHOC.....	23
2.10. Controle de qualidade microbiológico do LHOP.....	23
2.11. Contaminação microbiológica em Leite Humano Ordenhado	24
2.12. Klebsiella spp.....	26
2.13. Klebsiella spp. como agentes etiológicos em infecções neonatais	28
2.14. Klebsiella spp: dinâmica frente aos antimicrobianos	30
2.15. Klebsiella spp. produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)	31
2.16. Fenótipos e genes de resistência aos Carbapenêmicos em Klebsiella spp.	32
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Desenho e cenário do estudo.....	34
4.2. Aspectos éticos:	35
4.3. Coleta de dados.....	35
4.4. Coleta das amostras biológicas:	36
4.5. Identificação e Isolamento de micro-organismos.....	37
4.6. Identificação por Chromagar Orientation Medium	40
4.7. Confirmação de gênero e identificação de espécies de Klebsiella por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 41	
4.8. Realização de Antibiograma	42
4.9. Detecção Fenotípica de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs).....	43
4.10. Determinação fenotípica de carbapemenases tipo KPC em Klebsiella spp.	44
4.11. Detecção de genes de virulência e resistência por Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	45
4.12. Processamento de dados:	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CAPÍTULO 1.....	56

APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	85
APÊNDICE 2: QUESTIONÁRIO DOS PROCEDIMENTOS DURANTE A COLETA E ARMAZENAMENTO DOMICILIAR DE LEITE HUMANO ORDENHADO (LHO) E INFORMAÇÕES SOCIO-ECONÔMICAS.....	88
APÊNDICE 3: FORMULÁRIO PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ISOLADAS NO ESTUDO	91
ANEXO 1 : BULA BD CHROMagar ORIENTATION MEDIUM	93
ANEXO 2: BULA CEPA ATCC 70063 <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	100
ANEXO 3: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ENSINO EM PESQUISA – HOSPITAL ESAÚ MATOS - VITÓRIA DA CONQUISTA.....	101
ANEXO 4: DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DE PROJETO – IMS/UFBA.....	102
ANEXO 5: PARECER CONSUBSTANCIADO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – IMS/UFBA ...	103

LISTA DE FLUXOGRAMAS E FIGURAS

Fluxograma 1: Identificação das espécies de Enterobactérias nas amostras isoladas da região mamilo-areolar, mãos, leite cru e pasteurizado de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Esaú Matos.....	31
Fluxograma 1: Isolamento, identificação e caracterização de cepas de <i>Klebsiella</i> spp. isoladas do estudo.....	64
Figura 1: Fluxograma de trabalho do BLH. Fonte: ANVISA, 2008.....	17
Figura 1: Resultados do teste de indução de ESBL em amostras de <i>Klebsiella</i> spp.....	74
Figura 2: Modelo de etiquetas para frascos de amostra coletados de doadoras cadastradas no projeto.....	36
Figura 3: Interpretação de resultados no meio Triple Sugar Iron (TSI).....	39
Figura 4: Esquema de disposição dos discos para teste fenotípico para detecção de ESBL...	43
Figura 5: Esquema representativo do teste de Hodge modificado.	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Provas bioquímicas para identificação de espécies de <i>Klebsiella</i> spp.....	25
Quadro 1: Primers específicos utilizados nas reações de PCR em cepas de <i>Klebsiella</i> spp. isoladas no estudo, suas finalidades, tamanho e referência.....	65
Quadro 2: Primers específicos utilizados nas reações de PCR, suas finalidades, tamanho e referência em cepas de <i>Klebsiella</i> spp. isoladas no estudo.....	41
Quadro 2: Sequência dos primers utilizados para qPCR em cepas de <i>Klebsiella</i> spp isoladas no estudo e suas referências.....	67
Quadro 3: Relação de antibióticos testados frente às cepas de <i>Klebsiella</i> spp isoladas no estudo (CLSI, 2017)	42
Quadro 4: Sequência dos primers utilizados para qPCR em cepas de <i>Klebsiella</i> spp. isoladas no estudo, suas finalidades e referências.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise Descritiva de aspectos socioeconômicos e condições higiênico-sanitárias de coleta das doadoras de BLH integrantes do estudo.....	70
Tabela 2: Distribuição dos Micro-organismos isolados em amostras de swab de região mamilo-aureolar e mãos, LHOC e LHOP das doadoras participantes do estudo.....	71
Tabela 3: Distribuição dos resultados dos antibiogramas realizados com as cepas de <i>Klebsiella</i> spp (n= 15) isoladas em amostras de doadoras do BLH do Hospital Municipal Esaú Matos, Vitória da Conquista, 2018.....	73
Tabela 4: Resultados de cycle threshold (Ct) para os genes <i>rmpA</i> , <i>wcaG</i> , TEM, CTXM-1 e CTXM-2 em cepas de <i>Klebsiella</i> spp isoladas do estudo através da técnica de qPCR.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RN	Recém-nascido
OMS	Organização Mundial da Saúde
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTLV	Vírus Linfotrópico de Célula Humana
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
BLH	Banco de Leite Humano
LHO	Leite Humano Ordenhado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
LHOC	Leite Humano Ordenhado Cru
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido

KPC	<i>Klebsiella</i> produtora de Carbapemenase
TCLE	Termo de Consendimento Livre e Esclarecido
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CLSI	Clinical Laboratorial Standard Institute
mL	mililitro
μ L	microlitro
ng	nanograma
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados

1. INTRODUÇÃO

O leite humano possui características nutricionais ideais para o desenvolvimento de recém-nascidos (RNs) e garante proteção imunológica que permite o bom desenvolvimento dos RNs. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a amamentação exclusiva até os 6 meses de vida, porém existem situações que impossibilitam essa prática, como por exemplo em casos de mães soropositivas para HIV, HTLV, óbito materno, ou complicações de saúde do RN que cursam com necessidade de permanência no ambiente hospitalar (UTI neonatal). Para estes casos os Bancos de Leite Humano (BLHs) apresentam a oportunidade de alimentação dos RNs através de leite humano ordenhado (LHO) fornecido por doadoras.

Os BLHs são responsáveis pela seleção de doadoras, coleta, transporte, armazenamento, pasteurização e controle de qualidade do LHO. A coleta do LHO pode ser realizada no domicílio da doadora ou no próprio BLH e é uma etapa que necessita de critérios rigorosos de higiene como forma de evitar a contaminação do alimento, que por suas características nutricionais, pode servir também como um meio de crescimento excelente para várias espécies de micro-organismos que podem ser patogênicos para os RNs que o receberão, caso não sejam eliminados de forma eficaz no processo de pasteurização pelo BLH.

Espécies de enterobactérias apresentam relevância no ambiente hospitalar por serem micro-organismos em sua grande maioria comensais, e que residem principalmente no trato gastrointestinal de pessoas saudáveis, entretanto, podem adquirir fatores de virulência e resistência e se tornar patogênicos principalmente para indivíduos imunocomprometidos, como neonatos prematuros.

Dentre as espécies de enterobactérias de importância destaca-se *Klebsiella* spp. que comumente causa infecções neonatais como meningites, pneumonias, infecções do trato urinário, gastroenterites e sepse. Ademais, existem várias cepas destas espécies com multirresistência a antimicrobianos comumente utilizados em ambiente hospitalar como os beta-lactâmicos.

Frente a isso, o presente estudo propôs a identificar e caracterizar o perfil de virulência e resistência em cepas de *Klebsiella* spp isoladas de amostras de mãos, região mamilo-areolar, leite ordenhado e pasteurizado de doadoras do banco de leite cadastradas no BLH do Hospital Esaú Matos em Vitória da Conquista, Bahia, durante o ano de 2018.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Banco de Leite Humano: Disposições Gerais

A amamentação traz benefícios claros a curto prazo para a saúde infantil, reduzindo a mortalidade e a morbidade de doenças infecciosas (WHO, 2008). Segundo Campestrini (2006), a substituição do leite materno por leite artificial faz com que ocorra um aumento do número de óbitos de crianças em torno de 1,5 milhões a cada ano, no mundo.

A Organização Mundial de Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo nos primeiros seis meses de vida, sem nenhuma complementação de outros líquidos ou alimentos (WHO, 2001). Embora existam fórmulas específicas para a alimentação infantil, os benefícios comprovados da ingestão do leite materno para redução na incidência de diversas infecções neonatais (PARISH; BATHIA, 2008) e as características nutricionais ideais para o desenvolvimento dos RNs (MARQUES *et al*, 2004) justificam a utilização de LHO de doadoras de Banco de Leite Humano (BLH) para a alimentação de recém-nascidos (RNs), em sua maioria internados e que por diversos motivos são impossibilitados de obter o leite pela amamentação direta a exemplo dos prematuros que não dispõem de forças para sugar o leite materno, RNs que perderam a mãe no parto, genitoras com impossibilidade de produção de leite materno ou de amamentação (utilização de medicamentos, portadoras do vírus HIV, HTLV) ou RNs com necessidade de maior permanência no ambiente hospitalar (MENEZES, 2014).

Os BLHs são centros de apoio à amamentação que surgiram como uma estratégia de qualificação da assistência neonatal em termos de segurança alimentar e nutricional, com foco em ações que ajudam a reduzir a mortalidade infantil. Estão vinculados a um hospital de atenção materna e/ou infantil e são responsáveis por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, execução de atividades de coleta, seleção, classificação processamento, controle de qualidade e distribuição do leite humano ordenhado (LHO) (MAIA, 2006) (BRASIL, 2008).

O Brasil possui a maior rede de BLHs do mundo, com aproximadamente 60.000 doadoras cadastradas em seu território, que foi capaz de atender entre os anos de 2009 e 2016, mais de 1,8 milhão de RNs (BRASIL, 2017). Os estoques de LHO dos BLHs são mantidos por doadoras voluntárias que podem realizar a coleta do LHO no próprio BLH ou em sua residência. As doadoras recebem orientação do BLH quanto aos procedimentos a serem utilizados e o material necessário para a ordenha (touca descartável, máscara descartável e

frasco estéril). Quando coletado em domicílio o LHO é transportado para o BLH através de transporte vinculado ao serviço (BRASIL, 2007).

O processamento do LHO segue as etapas de coleta/recebimento do LHO; estocagem do leite humano ordenhado cru (LHOC); degelo e seleção; classificação; reenvase; pasteurização; liofilização (quando houver); controle de qualidade microbiológica do leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP); estocagem do LHOP, distribuição e porcionamento. O fluxo está descrito na Figura 1 e a realização de todas as etapas devem ser precedidas de ações para higiene pessoal dos envolvidos.

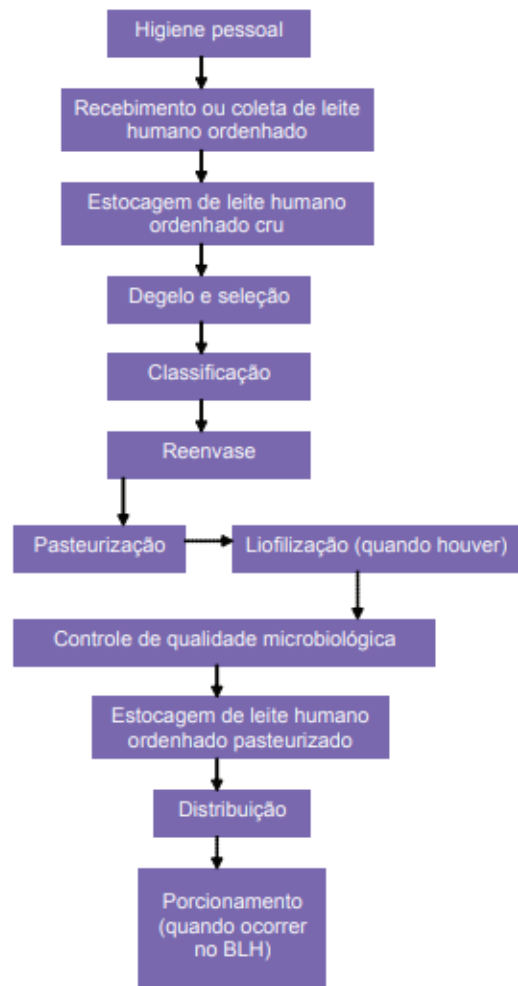


Figura 1: Fluxograma de trabalho do BLH. Fonte: ANVISA, 2008.

2.2. Seleção de doadoras

A doação de LHO deve ser voluntária, altruísta e não pode ser remunerada. O BLH pode realizar campanhas para incentivo e captação de novas doadoras, além de recepcionar, registrar e fazer a triagem baseada nos critérios de seleção de doadoras presentes na RDC nº 171, de 04 de Setembro de 2006: estar amamentando ou ordenhando LH para o próprio filho; ser saudável; apresentar exames pré ou pós-natal compatíveis com a doação; não fumar mais que 10 (dez) cigarros por dia; não usar medicamentos incompatíveis com a amamentação; não usar álcool ou drogas ilícitas; realizar exames (hemograma, VDRL, anti-HIV) quando não realizados no pré-natal; realizar outros exames conforme perfil epidemiológico local ou necessidade individual da doadora. O BLH deve manter registro com os dados das doadoras cadastradas para assegurar o cumprimento dos critérios para doação e para fins de rastreabilidade das amostras doadas.

Em 2016, Rechia e colaboradores realizaram revisão da produção científica brasileira sobre fatores que interferem na doação de LHO, e apontaram como os principais motivos que levam as nutrizes a doar o LHO o ingurgitamento mamário, excesso de produção láctea, conhecimento sobre a importância do LHO para os bebês internados, altruísmo e experiência prévia de dificuldade de amamentação.

2.3. Coleta de LHO

A coleta representa a primeira etapa das boas práticas de manipulação do LHO, devendo ser conduzida com rigor sanitário em relação aos riscos e perigos de contaminação do produto (MENEZES, 2011). Essa etapa pode ser realizada no BLH, posto de coleta ou no domicílio da doadora. Borges e colaboradores (2018) ressaltam a importância da coleta domiciliar como forma de assegurar maior cadastramento de nutrizes doadoras e, conseqüentemente, maior captação de LHO.

A ordenha, que é a ação de manipular a mama da lactente cuidadosamente para a retirada do leite, pode ser feita pela própria nutriz, por profissional de saúde ou por alguém de sua escolha, podendo ser realizada de forma manual, mais recomendada por ser menos traumática e dolorosa. Oliveira e colaboradores (2006) não indicam a utilização de bombas tira-leite pois podem gerar desconforto, risco e/ou agravamento de traumas mamilares além de serem de difícil limpeza e esterilização, propiciando a proliferação bacteriana que pode levar a contaminação do LHO.

Essa etapa pode ser considerada um indicador do controle de qualidade do LHO e deverá ser conduzida com rigor higiênico-sanitário capaz de garantir a manutenção das características imunobiológicas e nutricionais dos produtos que serão empregados na alimentação de bebês prematuros e de extremo baixo peso (SILVA, 2004). Nas coletas domiciliares as doadoras devem ser orientadas a procurar ambiente que não traga risco à qualidade microbiológica do LHO, evitando proceder a ordenha em banheiros e locais onde existam animais domésticos (BRASIL, 2001).

Como forma de garantir a qualidade do LHO é imprescindível que a nutriz seja orientada sobre os procedimentos necessários a serem adotados como prender os cabelos com auxílio de touca descartável (fornecida pelo BLH); lavar as mãos e antebraços com água corrente e sabonete até os cotovelos; manter as unhas sempre limpas e curtas; lavar as mamas com água corrente, segundo Fernandes e colaboradores (2000) o uso de sabonete pode ressecar os mamilos e predispor a fissuras; evitar conversar durante a coleta e desprezar os primeiros jatos de leite (0,5 a 1 mL) antes de iniciar a ordenha.

2.4. Acondicionamento e armazenamento do LHOC

A doadora deverá ser orientada a acondicionar o LHO em frascos fornecidos pelo BLH. Utiliza-se como embalagem para acondicionamento do leite humano ordenhado recipiente de vidro, estéril, com boca larga, tampa plástica rosqueável e volume de 50 a 500 mL, previamente testado (FIOCRUZ, 2003).

Antes da utilização os frascos devem ser armazenados em local exclusivo e devidamente higienizado no BLH e nos domicílios das doadoras deve ser solicitado que sejam armazenados em local limpo e fechado, livre de insetos, roedores e afastado de substâncias contaminantes (SILVA, 2004).

Quando não houverem os frascos específicos para a coleta em domicílio a orientação é que se utilize um frasco de vidro, com boca larga e tampa plástica, lave-o cuidadosamente com água e sabão e ferver o frasco e a tampa por 15 minutos, para secar a orientação é que permita naturalmente a eliminação da água com o frasco voltado para baixo em um tecido limpo, evitando tocar a parte interna do frasco e da tampa (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Durante a ordenha a doadora deve colocar o LHO direto no frasco sem preencher toda a capacidade, deixando sempre o volume 2 a 3 cm abaixo da borda. A estocagem do leite humano ordenhado cru (LHOC) no domicílio, antes do processamento, deve ser realizada sob

congelamento com temperatura inferior a -10°C por prazo máximo de 15 dias. O frasco deve ser mantido bem vedado e o ideal é o armazenamento do LHO separado de outros alimentos, porém quando não houver disponibilidade de armazenagem exclusiva, o leite deve ser acondicionado dentro de outro recipiente impermeável (saco ou recipiente plástico) (BRASIL, 2001); (FIOCRUZ, 2003); (SILVA, 2004); (BRASIL, 2006).

Quando for necessário completar o volume do frasco através de novas coletas deve-se utilizar um copo de vidro fervido por 15 minutos e após a coleta acrescentar ao LHO já congelado e levar imediatamente ao congelador, evitando o degelo (BRASIL, 2006).

2.5. Transporte do LHO

A manutenção da cadeia de frio a que deve ser submetido o leite humano ordenhado representa importante ação preventiva para a preservação da qualidade do alimento. Ao longo de toda a cadeia, o momento de transporte sempre agrega riscos de elevação de temperatura, o que, por conseguinte, favorece a ocorrência de não-conformidades. Para assegurar a manutenção da cadeia de frio no decorrer do transporte, o tempo entre o recebimento do produto no domicílio da doadora e a entrega na recepção do BLH não deverá ultrapassar seis horas (SILVA, 2004).

Para cumprir as normas estabelecidas na resolução nº 171 de 2006 o LHO deve ser transportado do domicílio da doadora até o BLH em recipiente isotérmico próprio e exclusivo, previamente limpo e desinfetado e com temperatura máxima controlada de -1°C para produtos congelados. Para garantir a temperatura deve ser utilizado gelo reciclável na proporção de três litros deste para cada litro de leite.

O veículo deve garantir a integridade e qualidade do produto, ser limpo, ser exclusivo no momento do transporte conforme rota estabelecida pelo BLH e ser adaptado para transportar o recipiente isotérmico de modo a não danificar o produto (BRASIL, 2001).

2.6. Recebimento e estocagem no BLH

Na recepção do LHO o responsável deverá utilizar os equipamentos de proteção individual (avental, máscara, gorro e luvas descartáveis) e observar a conformidade da embalagem – rotulagem, condições de higiene, integridade e vedação e do LHO – cor, ausência de sujidades e aspecto.

Todo frasco de leite doado que não preencher as especificações determinadas devem ser descartados conforme o disposto na RDC/Anvisa nº 306/2004 para resíduos do Grupo D,

podendo ser descartados diretamente na rede de esgoto (águas servidas), sem tratamento prévio (BRASIL, 2006).

A depender da demanda do BLH o LHO pode ser estocado ou seguir para as etapas de seleção e classificação. A estocagem do LHO no BLH, semelhante ao domicílio das doadoras, acontece por congelamento como forma de retardar a ocorrência de reações enzimáticas e químicas indesejáveis e inibir a multiplicação e a atividade dos microrganismos que se encontram no alimento (BRASIL, 2006). Em estudo realizado para avaliação da qualidade da fração lipídica do leite humano ordenhado e processado, Lira concluiu que a estocagem sob congelamento não altera significativamente a qualidade da fração lipídica do LHO (LIRA, 2002).

2.7. Degelo, seleção e classificação do LHO

O degelo consiste em um processo controlado para que o LHO passe da fase sólida para a fase líquida através da transferência de calor, sem permitir que a temperatura final exceda 5° C. Esse processo pode ser feito em banho-maria ou em micro-ondas (SILVA, 2004).

A seleção compreende a avaliação das condições de embalagem e rotulagem, presença de sujidades, verificação de cor, verificação da não-conformidade de características organolépticas - *off-flavor* e determinação da acidez titulável expressa em graus Dornic (BRASIL, 2006).

A classificação do LHO se dá através da classificação do período de lactação da doadora, acidez Dornic e da técnica analítica crematócrito, para cálculo estimado do conteúdo energético do LHO (ALMEIDA, 1999).

Os produtos que não preencherem as especificações determinadas para essas etapas devem ser descartados conforme o disposto na RDC/Anvisa nº 306/2004 para resíduos do Grupo D, podendo ser descartados diretamente na rede de esgoto, sem tratamento prévio (BRASIL, 2006).

2.8. Reenvase do LHO

O reenvase compreende o transporte do LHO de um recipiente para outro com objetivo de uniformizar volumes e embalagens. Para evitar contaminações o reenvase deve ocorrer com técnica microbiológica, sobre superfície de material liso, lavável e impermeável, resistente aos processos de limpeza e desinfecção – pode ser utilizado o campo de chama ou a

cabine de segurança biológica de fluxo horizontal (capela de fluxo laminar), desde que se assegure a esterilidade da operação (ROBBINS & BEKER, 2004).

2.9. Pasteurização do LHOC

A pasteurização é uma técnica eficaz e conhecida a muito tempo no campo da tecnologia de alimentos. O processo ocorre através da aplicação de um tratamento térmico ao LHO, adotando como referência a inativação térmica do microrganismo mais termorresistente, a *Coxiella burnetti*. Uma vez observado o binômio temperatura de inativação e tempo de exposição capaz de inativar esse microrganismo, pode-se assegurar que os demais patógenos também estarão termicamente inativados (BRASIL, 2001).

É importante salientar que a pasteurização não visa à esterilização do leite, mas sim a uma letalidade que garanta a inativação de 100% dos microrganismos patogênicos passíveis de estar presentes, quer por contaminação primária ou secundária, além de 99,99% da microbiota saprófita ou normal (BRASIL, 2001).

O LHOC coletado e aprovado nas etapas de seleção e classificação deve ser pasteurizado a 62,5° C por 30 minutos após o tempo de pré-aquecimento. Essa etapa é realizada com auxílio de banho-maria regulado na temperatura de 62,5° C, os frascos deverão ser dispostos no equipamento e o nível de LHO no frasco deve ficar abaixo do nível de água. Os frascos devem ser agitados a cada cinco minutos, por agitador automático acoplado no equipamento ou por um funcionário devidamente paramentado. Após o tempo necessário para a letalidade térmica os frascos devem ser resfriados, com auxílio de resfriador automático ou banho contendo água e gelo, até atingirem a temperatura de 5° C (SILVA, 2004).

2.10. Controle de qualidade microbiológico do LHOP

O controle de qualidade microbiológico do LHOP segue a lógica preconizada para alimentos, através da utilização de microrganismos indicadores de qualidade sanitária. Por se tratar de micro-organismos de cultivo simples, seguros e economicamente viáveis o grupo coliforme é amplamente utilizado. Visto que a pasteurização tem por objetivo eliminar as bactérias patogênicas, a presença de coliformes em LHOP o torna impróprio para consumo (BRASIL, 2001); (FIOCRUZ, 2003); (SILVA, 2004); (BRASIL, 2006)

Em 2004 Novak e Almeida desenvolveram uma metodologia alternativa para detecção de coliformes totais que foi implantada às técnicas de controle microbiológico do BLH (BRASIL, 2007). A técnica consiste na inoculação de quatro alíquotas de 1 mL cada de leite

humano ordenhado pasteurizado, pipetadas de forma independente e inseridas em tubos com 10 mL de caldo bile verde brilhante, a 50 g/L (5% p/v), com tubos de Durham em seu interior. Após a inoculação e incubação a 36 ± 1 °C, a presença de gás no interior do tubo de Durham caracteriza resultado positivo. Os resultados positivos, por sua vez, devem ser confirmados com auxílio de alça bacteriológica calibrada de 0,05 mL, utilizando-se tubos contendo BGBL na concentração de 40 g/L (4% p/v). Após a incubação desses tubos sob as mesmas condições do teste inicial, a presença de gás indicando a existência de microrganismos do grupo coliforme confirma que o produto é impróprio para consumo.

Amostras de LHOP com resultado positivo devem ser descartadas e as amostras sem crescimento podem ser estocadas em freezer com temperatura inferior a -10°C para distribuição em até 15 dias ou podem ser imediatamente distribuídas.

2.11. Contaminação microbiológica em Leite Humano Ordenhado

O processo de definição da qualidade do LHO ocorre após a avaliação das condições higiênico sanitárias utilizados desde a coleta à administração, somadas à avaliação de parâmetros nutricionais, imunológicos, químicos e microbiológicos após seu processamento (BORGES, 2018).

Um dos problemas mais importantes nos BLHs é o controle microbiológico do leite doado, pois este pode ser um excelente meio de cultura para vários tipos de micro-organismos (IKONEM, 1982); (FURTADO, 2010). A manutenção da qualidade microbiológica no manuseio e processamento do LHO é de suma importância visto que a constituição química do mesmo favorece de modo importante o crescimento bacteriano de micro-organismos patogênicos que podem ser adquiridos por contaminação externa e ocasionar importantes infecções, sobretudo em recém-nascidos (TYSON, et al, 1982); (ALMEIDA, et al, 1999).

Nobre e colaboradores em 2015 realizaram análise microbiológica de LHOC recebido no BLH em Tocantis através de coleta domiciliar e encontraram coliformes totais em 29% das amostras estudadas. O autor destaca que não existem parâmetros definidos de quantidade total de coliformes em amostra de LHOC na RDC nº 171 de 2006, que dispõe apenas sobre a necessidade de ausência de coliformes em amostras após a pasteurização (LHOP). Mas ressalta em seu estudo a importância de pesquisa em amostras de leite antes da pasteurização como um indicativo da qualidade da antissepsia realizada durante a coleta, armazenamento e transporte do leite, direcionando a necessidade de orientação das doadoras, e uma avaliação do processo, desde o contato inicial com a mãe, até a coleta do leite em sua residência.

Ademais, mesmo nos casos em que há eliminação do micro-organismo na amostra de LHO durante a pasteurização, a manipulação da amostra nas fases anteriores pode ser uma porta de entrada de bactérias no ambiente do BLH que é sempre atrelado a um Hospital Materno-Infantil, podendo contribuir para a disseminação desses micro-organismos no ambiente hospitalar (HINRICHSEN, 2013).

Em 2003, Serafini e colaboradores encontraram, em um BLH de Goiânia, espécies da família *Enterobacteriaceae* em 25,3% das amostras de LHOC e em 6,3% das amostras de LHOP, além de outros micro-organismos como *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, bolores e leveduras no leite cru. A presença de espécies de enterobactérias no LHO indica que o mesmo entrou em contato, de forma direta ou indireta, com material de origem fecal, pois tratam-se de espécies em sua maioria comensais, residentes na microbiota do trato gastrointestinal de seres humanos e animais saudáveis (NOVAK, 2001).

Em 2001, Novak e colaboradores encontraram resistência a antimicrobianos em 45% das cepas de patógenos oportunistas como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. e *Proteus* spp. de isolados obtidos de amostras de LHO de BLH no Rio de Janeiro, provavelmente decorrentes da pressão seletiva de antimicrobianos usados sobre a microbiota normal das doadoras ou da veiculação de micro-organismos resistentes do ambiente hospitalar através do contato das doadoras que permanecem no ambiente hospitalar por internação de seus RNs. Estes dados alertam para o problema da propagação de cepas de micro-organismos resistentes a antibióticos através do leite humano ordenhado.

Entre as espécies de Enterobactérias que são encontradas com frequência no leite humano *Klebsiella* spp., em especial a espécie *Klebsiella pneumoniae*, tem grande importância clínica em ambiente hospitalar (FALAGAS et al., 2014); (GUH et al., 2015), sobretudo em unidades neonatais considerando que: 1) comumente são patogênicos aos RNs, podendo afetar os RNs receptores de LHO por quadros de sepse e pneumonia. (PORTA e PAROLA, 2017); (MUSSI-PINHATA, 2001); (COSTA e SILVA, 2018); (CUNHA et al., 2014); (DJORDJEVIC, 2015), 2) comumente apresentam mecanismos de resistência a antimicrobianos o que dificulta o tratamento (SEIBERT, 2014).

Além disso, a ingestão de cepas patogênicas de *Klebsiella* spp. por RNs pode alterar a constituição da microbiota intestinal ainda em processo de formação e essa colonização pode ser uma etapa anterior ao estabelecimento de infecções, fenômeno de reconhecida importância no ambiente hospitalar (PAIXÃO e CASTRO, 2016).

2.12. *Klebsiella* spp.

2.12.1. Características gerais

Bactérias do gênero *Klebsiella* fazem parte da família *Enterobacteriaceae* e são ubiqüitários, possuem dois habitats comuns, sendo um deles o meio ambiente, onde são encontrados em águas superficiais, esgoto, solo e em plantas, e o outro a superfície mucosa de mamíferos, como humanos, cavalos ou suínos, que eles colonizam. Em humanos, *K. pneumoniae* pode estar presente na nasofaringe e no trato intestinal (DESIMONI et al., 2004); (MARTINEZ et al., 2004) e é a mais importante do gênero (VUOTTO et al., 2014).

Espécies desse gênero se apresentam como bastonetes gram-negativos, aeróbios facultativos, porém com crescimento mais significativo em condições aeróbias, não esporulados e cujo tamanho varia de 0,3 a 1 μ de diâmetro e 0,6 a 6 μ de comprimento. São imóveis e produzem colônias grandes e mucóides quando cultivadas em placas com nutrientes devido à produção de cápsula polissacarídica (GASTMEIER et al., 2003).

A utilização de provas bioquímicas permite a diferenciação de algumas espécies de *Klebsiella* sem a necessidade de técnicas mais onerosas na prática laboratorial. O quadro 1 apresenta algumas provas bioquímicas e seus resultados para as principais espécies de *Klebsiella* (ANVISA, 2014).

Quadro 1: Provas bioquímicas para identificação de espécies de *Klebsiella* spp.

Espécie/Provas Bioquímicas	Indol ²	Gás ³	Lisina ⁴	Ornitina ⁵	Motilidade ⁶	Lactose ⁷	Citrato ⁸	Arginina ⁹	Esculina*	Ureia**
<i>K. pneumoniae</i>	(-) 100 ¹	(+) 97 ¹	(+) 98 ¹	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(+) 98 ¹	(+) 98 ¹	(-) 100 ¹	(+) 99 ¹	(+) 95 ¹
<i>K. oxytoca</i>	(+) 99 ¹	(+) 97 ¹	(+) 99 ¹	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(+) 100 ¹	(+) 95 ¹	(-) 100 ¹	(+) 100 ¹	(+) 90 ¹
<i>K. ozaenae</i>	(-) 100 ¹	(+) 50 ¹	(-) 60 ¹	(-) 97 ¹	(-) 100 ¹	(-) 70 ¹	(-) 70 ¹	(-) 94 ¹	(+) 80 ¹	(-) 90 ¹
<i>K. rhinoscleromatis</i>	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(-) 100 ¹	(-) 80 ¹	(-) 100 ¹
<i>K. ornithinolytica</i>	(+) 100 ¹	(+) 100 ¹	(+) 100 ¹	(+) 100 ¹	(-) 100 ¹	(+) 100 ¹	(+) 100 ¹	(-) 100 ¹	(+) 100 ¹	(+) 100 ¹

¹Porcentagem de cepas com o resultado indicado entre parênteses. ²Avalia a capacidade do microrganismo utilizar o aminoácido triptofano como fonte de energia, através da enzima triptofanase, com a produção de indol. ³ Avalia a liberação de gás durante a fermentação da glicose realizada pela bactéria. ⁴Avalia a presença da enzima lisina-descarboxilase na bactéria. ⁵Avalia a presença da enzima ornitina descarboxilase na bactéria. ⁶Avalia a capacidade móvel da bactéria. ⁷Avalia a capacidade de a bactéria fermentar ou não a lactose. ⁸Avalia se a bactéria é capaz de utilizar o citrato como única fonte de

carbono. ⁹Avalia a presença da enzima Arginina De-hidrolase na bactéria. ^{*}Avalia a capacidade da bactéria de converter esculina em esculetina. ^{**}Avalia a presença da enzima urease na bactéria.

Fonte: Adaptado de MURRAY, 2014.

2.12.2. *Klebsiella* spp. como causador de infecções

As infecções por *Klebsiella* são causadas principalmente pela *Klebsiella pneumoniae*, a espécie mais importante do gênero. Das síndromes clínicas causadas por essa espécie destaca-se a pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse (SCARPATE & COSSATIS, 2009); (HLOPE & MCKERROW, 2014).

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista isolado predominantemente de indivíduos hospitalizados, imunodeprimidos e que possuem doenças de base como diabetes mellitus ou obstrução pulmonar crônica. A sua transmissão ocorre por contato direto ou por uma fonte comum, podendo ocorrer em qualquer local do hospital e afetar pacientes clínicos, cirúrgicos e pediátricos (HLOPE & MCKERROW, 2014). *Klebsiella pneumoniae* é responsável por infecções pediátricas relevantes em recém-nascidos prematuros (SEIBERT et al., 2014). Em infecções pediátricas a *Klebsiella pneumoniae* é o quarto agente patogénico responsável por quadros sépticos período neonatal (SIMÕES, 2016). Além disso, pode provocar infecção das vias biliares, do ouvido médio, dos seios paranasais, peritonite, conjuntivite, meningite e quadro séptico em lactentes (SEIBERT et al, 2014).

2.12.3. Mecanismos de patogenicidade e virulência em *Klebsiella* spp.

A patogenicidade da *Klebsiella* spp. pode ser atribuída à produção de enterotoxina estável ao calor; à capacidade de metabolizar a lactose; à presença de cápsula; à presença de adesinas com ou sem fímbrias que favorece sua adesão às mucosas e as células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para produzir o processo infeccioso e proteger a bactéria dos fatores bactericidas do soro acompanhado pela inibição da ativação dos componentes do complemento (SIMÕES, 2016).

Até o momento, existem quatro classes principais de fatores de virulência que foram bem caracterizadas em *K. pneumoniae*: a cápsula; lipopolissacarídeo (LPS); sideróforos; e as fímbrias (PACZOSA; MECSAS, 2016).

O fator de virulência de *Klebsiella pneumoniae* mais estudado é a cápsula. Lawlor e colaboradores evidenciaram em modelos de camundongos, em 2006, que cepas de *Klebsiella pneumoniae* modificadas para não produzir essa matriz de revestimento de polissacarídeo são

muito menos virulentas que as cepas encapsuladas selvagens. Os camundongos infectados com as cepas modificadas apresentaram menor carga bacteriana pulmonar, menor taxa de mortalidade e menos quadros de disseminação sistêmica do micro-organismo.

Ademais, cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* produzem uma hipercápsula, conhecida como cápsula hipermucoviscosa, que consiste em um exopolissacarídeo mucoviscoso mais robusto que o do revestimento da cápsula típica (YEH *et al*, 2007); (PAN *et al*, 2008). O gene plasmidial *rmpA* (regulador do fenótipo mucoide A; AB289644) é o responsável por conferir o fenótipo hipermucoso a *Klebsiella pneumoniae*, devido ao aumento da produção de polissacarídeos capsulares (DERAKHSAN, 2016).

De maneira geral, o fenótipo hipercapsular aumenta a resistência a uma variedade de defesas humorais, incluindo a morte pelo complemento, ação de beta-defensinas (HBD-1 a 3) e outros peptídeos antimicrobianos, como a proteína 1 de neutrófilos humanos e a lactoferrina (PACZOSA; MECSAS, 2016). Além disso, a hipercápsula tem sido correlacionada com o aumento da resistência à fagocitose por neutrófilos e macrófagos humanos em comparação com um número de cepas clássicas (POMAKOVA, 2012).

Foi evidenciado que a presença do desoxiaçúcar fucose na hipercápsula está associada ao escape da fagocitose pela bactéria. O gene *wcaG* está envolvido na síntese de fucose e, portanto, está associado à virulência de *K. pneumoniae* (YEH *et al*, 2010). Turton e colaboradores (2010) evidenciaram que o gene *wcaG* estava presente em 88% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* e foi encontrado em cepas hipervirulentas e clássicas.

2.13. *Klebsiella* spp. como agentes etiológicos em infecções neonatais

As infecções neonatais são um problema frequente e grave, especialmente em prematuros (FILHO *et al*, 2006). Constituem um problema de saúde pública, pois elevam o tempo de hospitalização, morbidade e mortalidade dos pacientes, além dos custos no tratamento (BOIÇA & BICUDO, 2005); (COLE *et al* 2017). A maior ocorrência de mortes por infecção está principalmente nos RNS de baixo peso (< 2500g) e, especialmente, nos RN's de muito baixo peso, com menos de 1.500g (PINHEIRO *et al*, 2009); (LARANJEIRA *et al.*, 2018); (VIEIRA, 1999).

O agente etiológico mais frequentemente encontrado em infecções neonatais é o *Staphylococcus* coagulase negativo, seguido por Gram-negativos como a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e em terceiro lugar, os fungos, com uma maior frequência de *Candida*, tanto

em países desenvolvidos quanto no Brasil (LARANJEIRA, 2018). *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp estão associadas a infecções hospitalares em neonatos, sendo responsáveis por cerca de 19% dos quadros de sepse nosocomiais e de mais de 30% das pneumonias (MUSSI-PINHATA, 2001).

Estudo realizado por Giannoni e colaboradores (2018) investigaram a epidemiologia de hemoculturas provenientes de 10 grandes centros pediátricos na Suíça entre os anos de 2011 e 2015 e evidenciaram cepas de *E.coli* e *Streptococcus* do grupo B como principais causadores de sepse precoce, *E. coli* foi responsável por 37% dos casos de sepse precoce em RNs pré-termos e 3% dos RNs nascidos a termo. E como agente etiológico de casos de sepse tardia adquiridas no ambiente hospitalar *E. coli* foi o terceiro micro-organismo mais isolado nas hemoculturas (16% dos casos) precedido por cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus aureus*.

Entre os meses de janeiro a outubro de 2011, Gonçalves avaliou a frequência, etiologia e fatores associados à sepse tardia em UTI neonatal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e encontrou nas hemoculturas positivas maior prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativa (37,5%), seguido de *Staphylococcus aureus* (18,8%). Entre as enterobactérias o predomínio foi de cepas de *Klebsiella* spp. (6,3%) e *Enterobacter* spp. (6,3%).

A *Klebsiella pneumoniae* pode causar grave morbidade e mortalidade, especialmente entre os recém-nascidos (LIU *et al*, 2008). A possibilidade de disseminação de cepas de *Klebsiella pneumoniae* em ambiente hospitalar e consequente infecção de pacientes com comprometimento do sistema imune foi relatada em 2006 por Cassettari e colaboradores que descreveram um surto em berçário por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) atribuído a colonização de profissional de saúde. Segundo o estudo os profissionais de saúde podem atuar como veículo de transmissão da bactéria entre pacientes.

A sepse por *Klebsiella pneumoniae* acomete o período neonatal principalmente em crianças prematuras, com comprometimento do estado nutricional e imunológico, submetidas a cuidados intensivos e internação hospitalar prolongada, necessitando de procedimentos invasivos (ALMUNEEF *et al*, 2017). Um estudo retrospectivo realizado por Modesto e Brito (2019) a partir da coleta de dados dos prontuários de 804 RN que estiveram internados na UTI

Neonatal de um hospital terciário entre janeiro de 2010 e dezembro de 2012 evidenciaram *Klebsiella pneumoniae* como o bacilo gram-negativo mais frequente em amostras de hemocultura.

2.14. *Klebsiella* spp: dinâmica frente aos antimicrobianos

Além de importantes causadores de infecções, cepas de *Klebsiella* spp. possuem a capacidade de funcionar como um reservatório de genes de resistência, podendo transferi-los para outras espécies de enterobactérias e para outros grupos bacterianos através de plasmídeos. A resistência apresentada por essa bactéria a antimicrobianos nos últimos anos se tornou um problema de saúde pública e preocupação em todos os campos da saúde (BRASIL, 2010); (GIAMARELLOU, 2010).

A resistência de *Klebsiella* spp. a antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida e é classificada em quatro mecanismos fundamentais. O primeiro está associado à alteração na permeabilidade de membrana quando há alterações na expressão e/ou na estrutura de proteínas transportadoras responsáveis pela entrada do fármaco na célula bacteriana, mecanismo importante para resistência a β lactâmicos e às quinolonas (DOUMITH *et al*, 2009). O segundo mecanismo é o de efluxo, onde bombas são responsáveis por remover os fármacos por transporte ativo do interior das bactérias (LI *et al*, 2015), com destaque para a superfamília de proteínas RND expressa em grande parte das enterobactérias (BLAIR; PIDOCK, 2009). O terceiro mecanismo de resistência ocorre através de alterações na proteína-alvo do antimicrobiano - as principais modificações envolvidas na resistência a antimicrobianos em enterobactérias são aquelas que conferem resistência às quinolonas e aos aminoglicosídeos e, mais recentemente, às polimixinas (KIM, 2014);

E por fim, o mecanismo mais importante para desenvolvimento de resistência em enterobactérias: a produção de enzimas capazes de degradar estes fármacos (NODARI, 2016). Sendo que a maioria dos genes codificantes de enzimas podem ser transferidos de forma horizontal, pois estão presentes em uma diversidade de elementos genéticos móveis. Os principais grupos de enzimas responsáveis pela resistência são as Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (AMEs), beta-lactamases e carbapemenases (PATERSON, 2006).

2.15. *Klebsiella* spp. produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas codificadas por plasmídeos e amplamente distribuídas entre as enterobactérias (podendo vir acompanhadas de genes de resistência a aminoglicosídeos e cloranfenicol), e são resultantes da mutação de genes da beta-lactamase comum, como TEM-1, TEM-2 e SHV-1, e têm capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de penicilinas e cefalosporinas de terceira geração, as quais foram originalmente desenvolvidas como drogas capazes de vencer a resistência bacteriana conferida pelas beta-lactamases comuns (DEHSRI *et al*, 2018); (OLIVEIRA, 2011); (COSTA, 2013).

A primeira ESBL do tipo SHV descrita e identificada foi a SHV-2, denominada assim por diferir em apenas um aminoácido da SHV-1, encontrada em isolados clínicos de *Serratia marcescens* e *K. pneumoniae* em 1983 (KNOTHE *et al*, 1983), enquanto que a primeira do tipo TEM foi relatada em 1987, a TEM-3, identificada também em isolados clínicos de *K. pneumoniae*. As β -lactamases das famílias TEM e SHV deram origem por mutação às ESBL clássicas, tendo surgido posteriormente as CTX-M que são atualmente as ESBL dominantes, sendo responsáveis não só por infecções nosocomiais, mas também por infecções adquiridas na comunidade (LICOPAN; SILVA, 2012); (MONIZ *et al*, 2016); (GIBOLD *et al* 2014); (RADICE, 2002).

As ESBL tornaram-se o principal problema de saúde pública no que diz respeito às infecções nosocomiais e comunitárias por membros da família *Enterobacteriaceae* (TOLENTINO, 2009); (LICOPAN; SILVA, 2012), devido ao alto perfil de disseminação, por serem codificadas por genes localizados em plasmídeos, e o surgimento constante de novas variantes (BROLUND, 2014); (BIEHL *et al*, 2016).

O ponto de urgência clínica tem sido a alta prevalência de ESBL em *Klebsiella* spp., um dos principais enteropatógenos associados às Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (D'ANGELO *et al*, 2016). Estima-se que aproximadamente 50% dos isolados de *Klebsiella* spp. de ambiente hospitalar sejam produtores de ESBL (LINCOPAN; SILVA, 2012), resultando em falha terapêutica e surtos por cepas resistentes no ambiente hospitalar, o que tem alto impacto na saúde pública diante das características de patogenicidade e endemicidade da bactéria (COSTA, 2013). Desse modo, diferentes clones de *Klebsiella* spp. produtores de CTXM têm sido relatados na literatura, especialmente em

unidades de tratamento intensivo (ANDRADE, 2010).

A ocorrência e a diversidade de ESBLs foram investigadas em 2008 por Ho e colaboradores em isolados de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos em fezes humanas de pacientes saudáveis em Hong Kong. Nesse estudo 17% dos isolados de *E. coli* e 50% dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos eram produtores de ESBL. O estudo evidenciou o papel dos micro-organismos comensais como reservatório para disseminação de ESBL (HO *et al.*, 2008).

2.16. Fenótipos e genes de resistência aos Carbapenêmicos em *Klebsiella* spp.

As carbapenemases são enzimas sintetizadas por microrganismos gram-negativos, os quais atualmente são considerados as principais causas de infecções resistentes. A presença dessa enzima em bactérias resulta na resistência aos antibióticos carbapenêmicos que é uma grande classe utilizada para o tratamento de infecções multirresistentes (DIENSTMANN *et al.*, 2010). As β -lactamases do tipo KPC podem hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo Carbapenêmicos, Cefalosporinas, Cefamicinas, Monobactâmicos e Clavulanato (YIGIT *et al.*, 2001); (PAPP-WALLACE *et al.*, 2010); (PATEL, BONOMO, 2011).

O mecanismo de ação dessas enzimas se dá inicialmente por meio de uma ligação não covalente com o anel β -lactâmico. Em seguida, o anel é atacado pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina no sítio ativo da enzima formando um grupo aciléster covalente. Posteriormente, a hidrólise do éster libera a enzima ativa e a droga inativa, além de uma molécula de água. Após o processo de hidrólise do agente antimicrobiano, a enzima é regenerada, ficando livre para inativar outras moléculas (DRAWZ; BONOMO, 2010)

No Brasil, supostamente, o primeiro relato de uma KPC (KPC-2) ocorreu em 2006, referente a espécimes de *K. pneumoniae* isolados a partir de quatro pacientes internados em unidade de terapia intensiva de um hospital da cidade de Recife, nordeste do Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2009). Atualmente, as bactérias produtoras de KPC são consideradas endêmicas nos Estados Unidos, Argentina, Brasil, Colômbia, China, Grécia, Israel, Itália, Polônia e Porto Rico (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; NORDMANN *et al.*, 2014). Além da capacidade de disseminação do gene blaKPC associado aos elementos genéticos móveis, tem sido observada a disseminação de clones internacionais de *K. pneumoniae* produtores de KPC (MATHERS *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar e caracterizar a patogenicidade e perfil de resistência à antibióticos de isolados de *Klebsiella* spp. em amostras de doadoras provenientes do Banco de Leite Humano do Hospital Esaú Matos em Vitória da Conquista, Bahia e correlacionar a presença microbiana com as condições higiênico-sanitárias das participantes do estudo.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar e identificar cepas de *Klebsiella* spp. em amostras colhidas de região mamilo-areolar, mãos e alíquotas de leite cru e após a pasteurização de doadoras selecionadas para o estudo.
- Determinar o perfil de resistência antimicrobiana bem como a presença de genes relacionados à resistência e virulência nos isolados.
- Verificar os procedimentos higiênico-sanitários adotados pelas doadoras para coleta e conservação do leite ordenhado e associar aos achados microbiológicos do presente estudo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho e cenário do estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal realizado com doadoras cadastradas no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos (BLH-HMEM), entre os meses de março e agosto de 2018.

Durante o ano de 2018 o BLH contou com 991 doadoras, mantendo uma média de 82 doadoras por mês, recepcionou e processou 1075 litros de leite humano durante o ano (Dados cedidos pelo Banco de Leite Hospital Esaú Matos). Segundo informações da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (RBLH), no ano 2017, o BLH-HMEM foi o campeão de captação de leite humano no estado da Bahia.

Além do cadastro de doadoras, coleta de leite, transporte e processamento das amostras de LHO, o BLH de Vitória da Conquista realiza ações permanentes de promoção da amamentação.

4.2. Aspectos éticos:

O presente estudo somente foi iniciado após passar por todos os trâmites autorizativos da Fundação de Saúde de Vitória da Conquista (FSVC) (Anexo 3) e do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/UFBA) (Anexo 4) sob o número de protocolo: 80800717.8.0000.5556 e parecer número 2.475.023 (Anexo 5).

4.3. Coleta de dados

Inicialmente as pesquisadoras responsáveis tiveram acesso no setor administrativo do BLH aos nomes e contatos de todas as doadoras em atividade e o volume médio de doação semanal das mesmas. O convite às doadoras para participação no estudo bem como a etapa de coleta de dados ocorreu no período compreendido entre Março e Agosto de 2018.

O BLH-HMEM padronizou o volume mínimo necessário para realização da pasteurização de 400 mL de LHO, portanto, quando há doações com volume inferior ao preconizado é necessário realizar um pool com amostras de doadoras diferentes. Como o presente estudo procurou avaliar possíveis rotas de contaminação do LHO a realização da análise de amostra após a pasteurização com LHO de doadoras distintas impediria tal objetivo. Portanto, foram convidadas através de contato telefônico todas as doadoras ativas do BLH Vitória da Conquista no período com volume regular de doação igual ou superior a 400 mL semanais.

Na ligação a pesquisadora apresentava de modo objetivo o projeto e convidava a doadora a contribuir com a pesquisa, para as doadoras que aceitavam participar foram agendadas as visitas domiciliares em data e horário de acordo com sua conveniência. Na visita domiciliar as doadoras receberam esclarecimentos mais aprofundados sobre a pesquisa e foi lido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE que apresentava os objetivos do estudo, os procedimentos que seriam realizados, os riscos, a ausência de benefícios diretos a participante e o sigilo e confidencialidade dos dados coletados (Apêndice 1), em seguida foram convidadas a assinar duas vias do TCLE, sendo uma entregue a cada participante do estudo.

Em seguida foram submetidas a uma entrevista utilizando como instrumento um questionário estruturado que versava sobre variáveis relacionadas aos hábitos higiênico-sanitários da coleta de leite humano e variáveis sócio-demográficas (Apêndice 2).

4.4. Coleta das amostras biológicas:

Após a assinatura do TCLE e de responderem ao questionário, as doadoras foram convidadas para coleta de amostras biológicas: mãos e região mamilo-areolar, em seguida uma alíquota de LHOC. Foi solicitado que as participantes se preparassem anteriormente como rotineiramente fazem para coleta de LHO que enviam ao BLH.

4.4.1. Primeira amostra – Mãos e região mamilo-areolar:

Antes da coleta, os materiais foram identificados com códigos de números sequenciais crescentes e as iniciais da doadora, para rastreabilidade dos resultados.

A primeira amostra foi colhida pela pesquisadora-farmacêutica habilitada devidamente paramentada, utilizando critérios de boas práticas para coleta de amostras. A coleta de material foi realizada com utilização de único Swab para coleta e transporte de amostras em meio STUART estéril – ABSORVE[®], que foi passado primeiro na região mamilo-areolar da doadora e posteriormente nas mãos. Todos os swabs foram transportados em caixa térmica, sem refrigeração e encaminhado ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Pesquisa – UFBA, para análises microbiológicas.

4.4.2. Segunda amostra – Coleta de LHO cru (LHOC):

Após a coleta da amostra cutânea, foi fornecido a doadora um frasco estéril para coleta de um pequeno volume inicial (aproximadamente 2mL) do LHO sendo solicitado as mesmas que procedessem a ordenha da mesma forma que realizam para doação do LHO. Para as doadoras que utilizavam bomba de sucção para retirar o leite orientou-se a retirada da alíquota utilizando o equipamento. O frasco com o LHO recebeu uma etiqueta para identificação conforme apresentado na Figura 2 (A). A alíquota de LHOC foi transportada em caixa térmica, refrigerada (com utilização de gelox), a temperatura da caixa térmica foi controlada e mantida no intervalo de 2 a 8° C, a amostra foi encaminhada ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde – UFBA, para análises microbiológicas.

4.4.3. Terceira amostra – Alíquota de LHO após pasteurização (LHOP):

No momento da visita domiciliar foi entregue a doadora uma etiqueta adesiva, Figura 2 (B), para ser fixada em frasco a ser preenchido com volume igual ou superior a 400mL para envio ao BLH por meio do fluxo normal de doação semanal sendo solicitado as mesmas que procedessem a ordenha da mesma forma.

Ao chegar ao BLH as amostras de LHO foram submetidas a controle de qualidade rotineiro: análise físico-química e pasteurização. As amostras identificadas com a etiqueta do estudo foram pasteurizadas normalmente e após o processo foi extraída uma alíquota de 2 mL pelo profissional responsável pelo controle de qualidade do LHO no BLH. Essa alíquota foi acondicionada em frasco de vidro estéril e encaminhada ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Pesquisa – UFBA em caixa térmica refrigerada para análises microbiológicas.

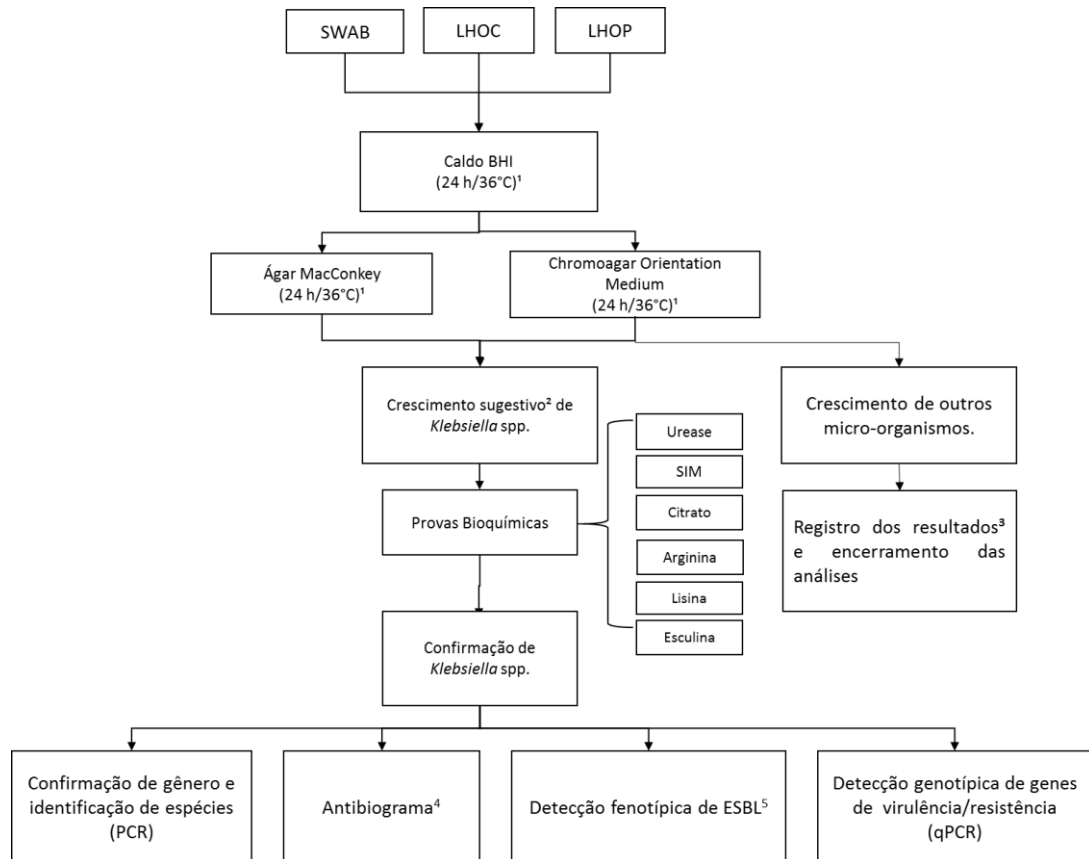
Projeto Enterobactérias e Enterococcus Amostra Leite Cru CÓDIGO SEQUENCIAL: INICIAIS DA DOADORA: ____ DATA DE COLETA: __/__/____ (A)	Projeto Enterobactérias e Enterococcus Amostra LEITE PASTEURIZADO CÓDIGO SEQUENCIAL: INICIAIS DA DOADORA: ____ DATA DE COLETA: __/__/____ (B)
--	---

Figura 2: Modelo de etiquetas para frascos de amostra coletados de doadoras cadastradas no projeto. (A) Leite Humano Cru, (B) Leite Humano Pasteurizado. Fonte: Acervo próprio.

4.5. Identificação e Isolamento de micro-organismos

Todas as amostras de cada doadora foram inicialmente inoculadas em meio de enriquecimento Brain Heart Infusion Broth (BHI) - HIMEDIA[®] e incubadas em estufa bacteriológica a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Em seguida foram repicadas em placas de Petri com meio Ágar MackConkey - HIMEDIA[®] e Difco Chromoagar Orientation – BD[®].

As colônias com crescimento no Ágar MacConkey e concomitante crescimento no meio cromogênico foram encaminhadas para identificação utilizando provas bioquímicas seguindo o Fluxograma 1.



Fluxograma 1: Identificação de *Klebsiella* spp. nas amostras isoladas da região mamilo-areolar e mãos (SWAB), leite cru (LHOC) e pasteurizado (LHOP) de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Esaú Matos. ¹ Incubação em estufa microbiológica a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas em aerobiose e umidade 70%. ²Para o Chromoagar orientation: Colônias de *Klebsiella* spp. conforme a bula CromAgar Orientation BD® Anexo 1. Para o MacConkey: Colônias rosas (fermentadoras de lactose) ou transparentes (não fermentadoras de lactose). ³Resultados de características coloniais conforme bula CromAgar Orientation BD® Anexo 1. ⁴Antibiograma por disco-difusão recomendações CLSI 2017. ⁵Teste de indução por técnica de disco aproximação (Jarlier, 1998) incubação em estufa microbiológica a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas em aerobiose e umidade 70%.

4.5.1. Cultivo, identificação e confirmação

Todos os micro-organismos com crescimento no meio Ágar MacConkey HIMEDIA[®] tiveram suas características observadas afim de facilitar o processo de identificação. O Ágar MacConkey é um meio seletivo para bactérias gram-negativas e além disso é um meio indicador uma vez que sinaliza espécies fermentadoras de lactose com formação de colônias rosas.

Colônias isoladas do Ágar MacConkey HIMEDIA[®] foram semeadas com agulha por semeadura mista com punctura e estrias em tubo inclinado com Ágar Triple Sugar Iron (TSI) - HIMEDIA[®]. O tubo foi incubado por 24 horas em temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica com condição de aerobiose e umidade de 70% e os tubos com micro-organismos fermentadores de glicose, com viragem de cor da base do meio de vermelho para amarelo (Figura 3, Tubos 2 e 4) foram confirmados como Enterobactérias e submetidos as provas bioquímicas para identificação de gênero e espécie. A semeadura em TSI permite, além da confirmação de enterobactérias pela fermentação da glicose, a descrição da fermentação de outros açúcares, lactose e/ou sacarose através da alteração de cor do ápice do tubo (Figura 3, Tubo 2), a formação de gás (Figura 3, Tubo 3) e produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) pelas bactérias. As características observadas no tubo foram descritas no formulário de Identificação (Apêndice 3)

As provas bioquímicas utilizadas para identificação das enterobactérias foram: (1) detecção da enzima Urease; (2) produção de H_2S , produção de indol pela degradação do triptofano e avaliação de motilidade; (3) capacidade do micro-organismo utilizar o citrato como única fonte de carbono; (4) presença da enzima arginina descarboxilase; (5) presença da enzima lisina descarboxilase e (6) capacidade de hidrólise da esculina. Para isso foram utilizados respectivamente os meios: (1) Urea Agar Base – HIMEDIA[®]; (2) Ágar SIM Medium - HIMEDIA[®]; (3) Simmons Citrate Agar - HIMEDIA[®]; (4) Caldo Arginina Descarboxilase - MICROMED[®]; (5) Lysine Iron Agar - HMMEDIA[®]; (6) Esculin Agar - HMMEDIA[®]. Com exceção do caldo Arginina, que foi preparado no estado líquido, todos os meios semissólidos foram preparados em tubos inclinados e os micro-organismos foram semeados com agulha em semadura mista, todos foram incubados em estufa microbiológica a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a leitura foi realizada com 24 horas. A interpretação das provas bioquímicas foi realizada utilizando o Manual de Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014, disponível em www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf. Todas as provas

bioquímicas foram validadas com utilização das cepas *K. pneumoniae* ATCC700603. (Anexo 2)

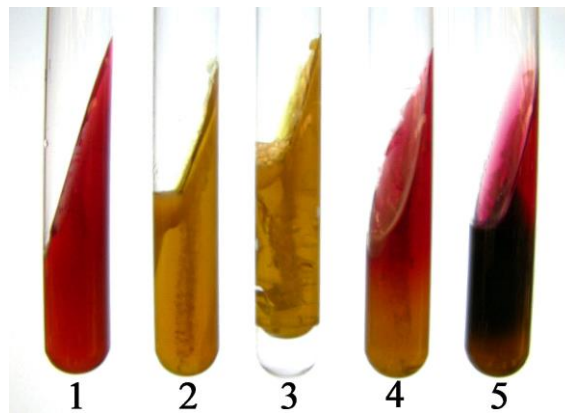


Figura 3: Interpretação de resultados no meio Triple Sugar Iron (TSI). (1) Meio TSI em coloração original (2) Enterobactéria: fermentador de glicose (alteração de cor da base do tubo por alteração no pH do meio devido a produtos da fermentação dos açúcares) e fermentador de lactose e sacarose (alteração de cor no ápice do tubo por alteração no pH do meio devido a produtos da fermentação dos açúcares). (3) Enterobactéria, características de fermentação semelhantes ao (2) e produtor de gás (formação de espaços vazios e/ou rachaduras no meio). (4) Enterobactéria (fermentação de glicose apontada por alteração na cor da base do tubo) não fermentador de lactose e sacarose (sem alteração de cor no ápice do tubo). (5) Micro-organismo produtor de H₂S, evidenciado pela formação de complexo negro através da reação entre o gás e o Ferro presente no meio. Fonte: SPILATRO, 2004.

4.6. Identificação por Chromagar Orientation Medium

Para aumentar a sensibilidade e facilitar o processo de identificação dos micro-organismos, após o repique em BHI as amostras também foram inoculadas em meio cromogênico BD Chromagar Orientation Medium – Becton Dickinson®, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 36±1°C por 24 horas em aerobiose e umidade de 70% e a análise dos resultados foi feita baseada nas instruções do fabricante (Anexo 1): Colônias de tamanho médio, azul a azul-escuro, com ou sem halos violetas eram indicativas de bactérias do grupo KES (*Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*). Os resultados de crescimento observados no meio cromogênico foram registrados em planilha (Apêndice 3).

A utilização concomitante do meio MacConkey e Chromagar Orientation Medium permitiram a identificação de outras espécies identificadas nas amostras, mesmo não sendo as de interesse. Esses resultados também foram registrados na planilha de estudo.

4.7. Confirmação de gênero e identificação de espécies de *Klebsiella* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para confirmar o gênero *Klebsiella* spp. e identificar se as cepas isoladas pertenciam as espécies mais comuns desse gênero: *Klebsiella pneumoniae* ou *Klebsiella oxytoca*, foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O DNA foi extraído através do método de fervura descrito por Fan e colaboradores (1995) e submetido à técnica de PCR para identificar os genes *gyr A* (confirmação do gênero *Klebsiella*), *peh X* (identificação da espécie *Klebsiella oxytoca*) e *rpoB* (identificação da espécie *Klebsiella pneumoniae*) utilizando os primers definidos no Quadro 2.

A reação foi preparada para um volume final de 50 µL por tubo, compreendendo: 5 µL de tampão PCR, 1,5 µL de MgCl₂; 8 µL de dNTP, 1 µL de cada um dos primers, 100 ng de DNA genômico e 0,25 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Brasil).

Em um termociclador foram feitas as amplificações, obedecendo a uma desnaturação inicial de 95° C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos térmicos de desnaturação cada um consistindo de 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 55°C para anelamento, 2 minutos a 72° C, concluindo com uma extensão final a 72° C por 10 minutos para cada um dos genes.

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0%, corados com 2,5 ul de brometo de etídio (10 mg/mL) por 40 minutos, visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Um marcador de peso molecular “DNA Ladder de 100 pb” (Invitrogen®, Brasil) foi utilizado como padrão para o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados, descritos no Quadro 2. Como controle positivo da reação foi utilizada a cepa *K. pneumoniae* ATCC700603.

Quadro 2: Primers específicos utilizados nas reações de PCR em cepas de *Klebsiella* spp. isoladas no estudo, suas finalidades, tamanho e referência.

Gene	Seqüência do Primer (5' → 3')	Tamanho do produto	Referência
<i>rpoB</i>	F: 5' CAACGGTGTGGTTACTGACG 3' R: 5' TCTACGAAGTGGCCGTTTTTC 3'	108 bp	Chander et al, 2011
<i>pehX</i>	F:5'GATACGGAGTATGCCTTTACGGTG 3' R:5'TAGCCTTTATCAAGCGGATACTGG 3'	343 bp	Chander et al, 2011
<i>gyrA</i>	F:5'CGCGTACTATACCCATGAACGTA3' R: 5'ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG3'	441 bp	Brisse and Verhoef. 2001

4.8. Realização de Antibiograma

As amostras isoladas de *Klebsiella* spp. foram submetidas a avaliação da atividade antimicrobiana. A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada através da utilização do teste de difusão em ágar (BRASIL, 2010) e conforme recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2017.

Os ensaios foram realizados a partir de isolados com os quais foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL). As suspensões foram semeadas, com ajuda de swabs esterilizados sobre a superfície seca de placas de Petri contendo ágar Difco™ Mueller Hinton – Becton Dickinson®, de maneira a se obter um crescimento uniforme e confluyente sobre a superfície dos meios inoculados.

Os discos utilizados estão descritos no Quadro 3 que apresenta os antimicrobianos determinados pela CLSI 2017 para realização de teste de sensibilidade e foram inclusos os carbapenêmicos, visto que a resistência de enterobactérias aos antimicrobianos dessa classe é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, particularmente pela elevada mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas (NORDMAN, 2012) (ANDERSON, 2007).

Após incubação durante 24h a 36°C, as leituras e as interpretações dos diâmetros dos halos de inibição realizadas segundo recomendações do CLSI (2017). Para validação do teste realizado foi utilizada as cepas *K. pneumoniae* ATCC700603.

Quadro 3 – Relação de antibióticos testados frente às cepas de *Klebsiella* spp isoladas no estudo (CLSI, 2017).

Discos de antimicrobianos	Ampicilina-sulbactam 20 µg Laborclin®
	Amoxicilina 10 µg - Laborclin®
	Amoxicilina-ácido clavulânico 30 µg - Laborclin®
	Amicacina 30 µg - Laborclin®
	Piperaciclina-tazobactam 110µg - Laborclin®
	Cefazolina 30 µg - Laborclin®
	Cefalotina 30 µg - Laborclin®
	Cefuroxima 30 µg - Laborclin®
	Tetraciclina 30 µg - Laborclin®
	Nitrofurantoína 300 µg - Laborclin®
	Ertapenem 10 µg - Laborclin® *
	Imipenem 10 µg - Laborclin® *
	Meropenem 10 µg - Laborclin®*

*Carbapenêmicos inclusos além da lista original do CLSI.

4.9. Detecção Fenotípica de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

Todas as cepas de *Klebsiella* spp. isoladas foram submetidas ao teste de detecção fenotípica de ESBL através da metodologia de disco-aproximação (JARLIER, 1998). Os isolados foram preparados em suspensão bacteriana com solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland.

A suspensão foi semeada por disseminação em placa de Petri contendo o meio Difco™ Mueller Hinton – Becton Dickinson®, de maneira a se obter um crescimento uniforme e confluyente sobre a superfície do meio e foram adicionados os discos de Cefoxitina 30 µg - Laborclin®, Amoxicilina/Ácido Clavulânico 30 µg - Laborclin®, Ceftazidima 30 µg - Laborclin®, Cefotaxima 30 µg - Laborclin®, e Cefepime 30 µg - Laborclin®, separados por 20 mm de distância entre si, com o disco de Amoxicilina/Acido clavulânico no centro (Figura 4).

A leitura dos resultados aconteceu após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 36°±1° C e foram considerados positivos para produção de ESBL as cepas em

que houve uma deformação dos halos de inibição próximos ao disco do inibidor de beta-lactamase ou aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição (zona fantasma) entre o inibidor e um dos substratos beta-lactâmicos.

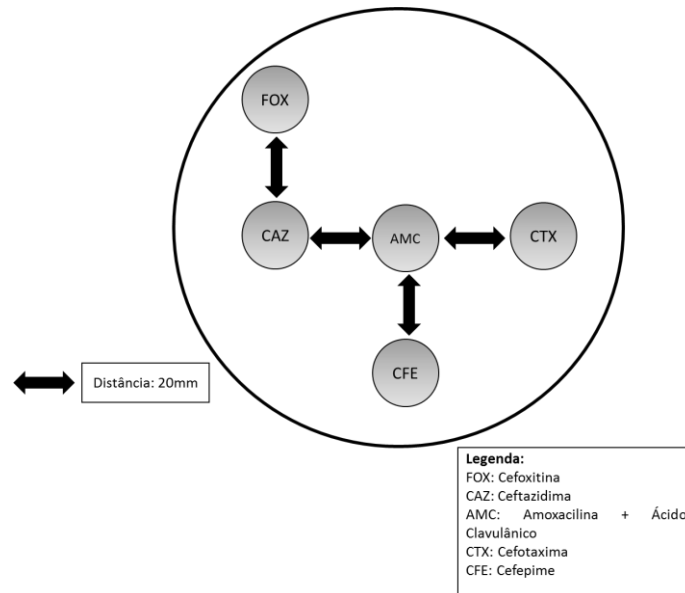


Figura 4: Esquema de disposição dos discos para teste fenotípico para detecção de ESBL. Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2009.

4.10. Determinação fenotípica de carbapemenases tipo KPC em *Klebsiella spp.*

Para todos os micro-organismos identificados como *Klebsiella spp* foi realizado o teste de Hodge modificado (LEE et al., 2000). O teste consistiu no preparo de uma suspensão de uma cepa ATCC de *E.coli* (ATCC 25922) em solução salina estéril ajustada para turvação 0,5 MacFarland. A suspensão foi diluída dez vezes e posteriormente semeada com swab estéril por disseminação em placa de petri contendo meio Difco™ Mueller Hinton – Becton Dickinson® (ANDERSON, 2007).

No centro da placa foi adicionado um disco de Meropenem 10 µg - Laborclin® e das cepas a serem testadas foi retirada uma colônia com alça bacteriológica e realizada estria fina da borda do disco até a borda da placa (Figura 5). A placa foi incubada em estufa bacteriológica na temperatura de 36±1° C e a leitura foi realizada após 24 horas. Foram considerados positivos para produção de carbapemenases as placas onde foi possível observar a distorção do halo de inibição na região onde ocorre concomitantemente o crescimento da cepa padrão *E.coli* e da cepa testada (LEE et al., 2000).

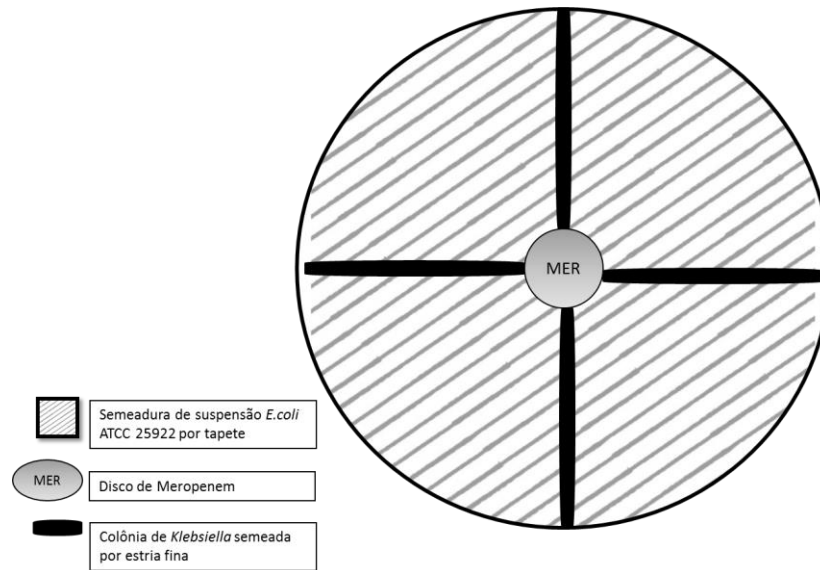


Figura 5: Esquema representativo do teste de Hodge modificado. Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2009

4.11. Detecção de genes de virulência e resistência por Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para todos os isolados identificados como *Klebsiella* spp. foram pesquisados os genes: (1) de virulência: *rmpA*, envolvido na regulação da síntese extracapsular de polissacarídeos e expressão de fenótipo hiper mucoviscoso e *wcaG*, associado ao aumento da capacidade da bactéria de escapar de fagocitose por macrófagos; (2) de resistência associados a produção de ESBLs dos tipos SHV-1, TEM-1, CTXM-1 e CTXM-2.

Foi determinado também que caso as amostras apresentassem resistência ou sensibilidade intermediária aos carbapenêmicos no antibiograma e/ou resultados positivos no teste de Hodge modificado seria avaliada a presença do gene KPC, porém todas as cepas apresentaram sensibilidade aos carbapenêmicos no antibiograma e foram negativas no teste de Hodge modificado. Diante disso, a detecção molecular do gene de resistência associado a presença de carbapenemases (KPC) não foi realizada nas amostras isoladas.

O DNA das cepas isoladas foi extraído pelo método de fervura descrito por Fan et. al. (1995). A técnica de qPCR foi realizada utilizando o mastermix constituído do sistema SYBR Green (Qiagen, EUA) e os primers específicos para cada um dos genes, descritos na Quadro 4. O volume para cada reação foi de 6 microlitros de água ultrapura tipo I, livre de DNase - LGC Biotecnologia®, 10 microlitros de SYBR Green®, 1 microlitro de cada primer (forward e reverse) e 2 microlitros de DNA na concentração de 100 ng/mL.

Os testes foram feitos em duplicata e a termociclagem foi realizada no termociclador Step One Plus (Applied Biosystem, EUA), submetidas as condições de ciclagem definidas por Gomes et al. 2018: 40 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 15 segundos e anelamento / extensão a 60 ° C por 60 segundos. Posteriormente, foi realizada análise da curva de melting para verificar a amplificação inespecífica e / ou formação de dímeros de primers.

Os resultados foram expressos em Cycle Threshold (CT) e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram curva de amplificação igual ou anterior ao CT 32. Como a necessidade de avaliação dos resultados era qualitativa (presença ou ausência do gene) não foi necessária a realização de curva padrão.

Quadro 4: Sequência dos primers utilizados para qPCR em cepas de *Klebsiella* spp. isoladas no estudo, suas finalidades e referências.

Gene alvo	Sequência do iniciador (5' 3')	Referências
<i>blaSHV-1</i>	F: 5' TCAGCGAAAAACACCTTG 3' R: 5' TCCCGCAGATAAATCACC 3'	Dehshri et al, 2018
<i>blaTEM</i>	F: 5' CTTCTGTTTTTGCTCACC 3' R: 5' AGCAATAAACCCAGCCAGC 3'	Dehshri et al, 2018
<i>blaCTXM-1</i>	F: 5' GACGATGTCACTGGCTGAGC 3' R: 5' AGCCGCCGACGCTAATACA 3'	Dehshri et al, 2018
<i>blaCTXM-2</i>	F:5'GCGACCTGGTTAACTACAATCC3' R:5'CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC 3'	Dehshri et al, 2018
<i>blaKPC</i>	F:5'CGGTTACGGCCAGTGGGAATA3' R:5'GACGCAGACCGAAATCGAACT3'	Peirano et al., 2009
<i>rmpA</i>	F: 5' ACTGGG CTA CCT CTG CTT CA 3' R: 5' CTT GCA TGA GCC ATC TTT CA 3'	Derakhshan et al, 2016
<i>wcaG</i>	F: 5' GGT TGG GTC AGC AAT CGT A 3' R: 5' ACT ATT CCG CCA ACT TTT GC 3'	Derakhshan et al, 2016

4.12. Processamento de dados:

Todos os dados obtidos no estudo (questionário, resultados de crescimento bacteriano, de antibiograma, de testes fenotípicos e detecção de genes) foram registrados em planilha no Microsoft Excel 2007 e em seguida foi realizada a análise descritiva através do programa estatístico EPI INFO (versão 3.5.1.). Para a comparação de frequências foi utilizado o Teste de qui-quadrado, considerando índice de significância $p < 0,05$.

5. REFERÊNCIAS

- ALLGAYER, N.; SCHIRMER, H.; AMARO CASTELAN, J. Concordância dos resultados do sistema BD Phoenix com provas bioquímicas manuais na identificação de Enterobactérias em amostras clínicas. **Clinical & Biomedical Research**, [S.l.], v. 35, n. 1, fev. 2015. ISSN 2357-9730.
- ALMEIDA, J.A.G. Amamentação: um híbrido de natureza e cultura. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1999.
- ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre , v. 80, n. 5, supl. p. s119-s125, Nov. 2004.
- ALMUNEEF, M., MEMISH, Z., BALKHY, H., ALALEM, H., ABUTALEB, A. Ventilator-Associated Pneumonia in a Pediatric Intensive Care Unit in Saudi Arabia: A 30-Month Prospective Surveillance. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, 25(9), 753-758, 2017.
- ANDERSON, K.F; LONSWAY, D.R; RASHEED, J.K. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, 45(8):2723–2725, 2007.
- ANDRADE, L. N; MINARINI, L. A. R.; PITONDO-SILVA, A; CLÍMACO, E. C; PALAZZO, I. C. V; MEDEIROS, M. I.; , DARINI, A. L. C. Determinants of β -lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. **Can J Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 399-407, 2010.
- ANVISA. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo V. Brasília, DF, 2014.
- BIEHL, L. M; SCHMIDT-HIEBER, M; LISS, B; CORNELLY, O. A; VEHRESCHILD, J. M. Colonization and infection with extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in high-risk patients – Review of the literature from a clinical perspective. **Crit Rev Microbiol**, Feb;42(1):1-16. 2016.
- BOIÇA, C. M, BICUDO, J.N. Infecção, prematuridade, baixo peso e uso de antibiótico em unidade de terapia intensiva neonatal. **Rev. Médica Ana. Costa**. Fev;10(1):1-3, 2005.
- BORGES, M. S; OLIVEIRA, A. M. M; HATTORI, W. T; ABDALLAH, V.O.S. Qualidade do leite humano ordenhado em banco de leite e no domicílio, **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre , v. 94, n. 4, p. 399-403, ago. 2018.
- BLAIR, J.M; PIDDOCK, L.J. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. **Current opinion in microbiology**, 12. 512-9, 2009.
- BRAGA, R. L. L, PEREIRA, A. C. M; FERREIRA, A. F; ROSA, A. C. P; PEREIRA-MANFRO, W. F. Intracellular persistence of enteroaggregative *Escherichia coli* induces a proinflammatory cytokines secretion in intestinal epithelial T84 cells. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo , v. 55, n. 2, p. 133-137, Junho 2018;

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano. 4. ed. Brasília, DF, 2001. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, n.117).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 set. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília, DF, p.160, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano, 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/banco-de-leite/rede-brasileira-de-bancos-de-leite-humano>> Acessado em: 07 de abril de 2018

BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed., v. 1, p. 59-73. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. Disponível em: http://anfarmac.campaignsender.com.br/registra_clique.php?id=TH|teste|57227|27417&url=http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm. Acesso em: 01 março 2018.

BRASIL. **Portal da Saúde**. Ministério da Saúde lança Campanha para Doação de Leite Humano. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/28416-ministerio-da-saude-lanca-campanha-para-doacao-de-leite-humano>. Acesso em: 16 junho 2018.

BROLUND, Alma. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. **J Infect Ecol Epidemiol**, 2014, 4.

CALDORIN, M., ALMEIDA, I. A. Z. C., PERESI, J. T. M.; ALVES, E. C. A. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. BEPA, **Bol. epidemiol. paul.** (Online), São Paulo, v. 10, n. 110, fev. 2013.

CAMPESTRINI, S. **Súmula de aleitamento materno**. Curitiba: PUCPR, 2006.

CASSETTARI, V. C, SILVEIRA, I. R; BALSAMO, A. C. FRANCO, F. Surto em berçário por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido atribuído à colonização de profissional de saúde portador de onicomicose. **J. Pediatr**. Porto Alegre, v. 82, n. 4, p. 313-316, Agosto, 2006.

CLSI. M100-S26: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. USA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 27 ed., 2017.

CHANDER, Y; RAMAKRISHNAN, M.A; JINDAL, N; HANSON, K; GOYALL, S. M. Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Intern J Appl Res Vet Med**. Vol. 9, n 2, 2011.

COLE, B. K; SCOTT, E; ILIKJ, M; AKINS, D. R., DYER, D. W; CHAVEZ-BUENO. Route of infection alters virulence of neonatal septicemia *Escherichia coli* clinical isolates. **PloS one**, 12(12), e0189032, 2017.

COSTA, S. I. A. D. **Disseminação horizontal de genes que codificam para Beta-Lactamases de espectro alargado em isolados de Enterobacteriaceae de Origem**

Hospitalar. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2013.

COSTA, M; SILVA, W. N. Investigação dos principais micro-organismos responsáveis por infecções nosocomiais em utis neonatais: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres.** v. 7 n. 1, 2018.

CUNHA, R.C.M.L.; ARAÚJO, G.C.; BORGES, M.R.M.M.; QUEIROZ, M.V.F.; PIMENTA, R.S. Prevalência de sepse e fatores de risco em neonatos de unidade de terapia intensiva de referência em Palmas, Tocantins, Brasil. **Rev. panam. infectol,** p. 86-94, 2014.

D'ANGELO, R. G; JOHNSON, J. K; BORK, J. T; HEIL, E. L. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 17:7, 953-967, 2016.

DERAKHSHAN, S, NAJAR PEERAYEH, S; BAKHSHI, B. Association Between Presence of Virulence Genes and Antibiotic Resistance in Clinical *Klebsiella Pneumoniae* Isolates. **Laboratory Medicine**, 47(4), 306–311, 2016.

DESIMONI, M.C., ESQUIVEL, G.P., MERINO, L.A. Fecal colonization by extended-spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. **Enferm. Infect. Microbiol. Clin.** v. 22, n. 9, p. 507-11, 2004.

DJORDJEVIC, Z. M; MARKOVIC-DENIC, L, FOLIC, M. M, IGRUTINOVIC, Z, JANKOVIC, S.M. Health care–acquired infections in neonatal intensive care units: Risk factors and etiology. *AJIC: American Journal of Infection Control*, V.43(1), pp.86-88, 2015.

DOUMITH, M; ELLINGTON, M. J; LIVERMORE, D.M; WOODFORD, N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2009.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Journal of Clinical Microbiology** . v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

FALAGAS, M. E.; TANSARLI, G. S.; KARAGEORGOPOULOS, D.E.; VARDAKAS, K. Z. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1 -6, 2014.

FERNANDES, A. T. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: **Atheneu**, 2000. v. 1

FILHO, V.; RESCHKE, C.; HORNER, R;. Perfil Epidemiológico das Infecções Hospitalares na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, Brasil. **Rev Bras Anál Clin.** 38(4):267-27, 2006.

FIOCRUZ (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ). Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano. Rio de Janeiro, 2003.

FURTADO, M. A. M. *et al.* Análise de Coliformes em Leite Humano Ordenhado. **Interagir: pensando a extensão**, Rio de Janeiro, n. 15, p. 29-34, jan./dez. 2010.

GASTMEIER, P; GRONEBERG, K; WEIST, K; RUDEN, H. A cluster of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in a neonatal intensive care department: identification of transmission and intervention. **Am J Infect Control**.31:424-30, 2003.

GIANNONI, E., AGYEMAN, P. K. A., STOCKER, M., POSFAY-BARBE, K. M., HEININGER, U., SPYCHER, B. D; SCHLAPBACH, L. J. Neonatal Sepsis of Early Onset, and Hospital-Acquired and Community-Acquired Late Onset: A Prospective Population-Based Cohort Study. **The Journal of Pediatrics**, Out; 201:106-114.e4, 2018.

GIBOLD, L.; ROBIN, F; TAN, R. N; DELMAS, J; BONNET, R. Four-year epidemiological study of extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French teaching hospital. **Clin Microbiol Infect**; 20:O20-O26, 2014.

GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. **Int. J. Antimicrob**, Atenas; 36:50 – 54, 2010.

GONÇALVES, M. F. M. **Avaliação da frequência, etiologia e fatores de risco associados à sepse tardia em UTI neonatal** 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

GOMES, A. É. I; STUCHI, L. P; SIQUEIRA, N. M. G; HENRIQUE, J. B; VICENTINI, R; RIBEIRO, M. L; FERRAZ, L. F. C. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR. **Scientific Reports**, 8(1), 2018.

GUH, A. Y; BULENS, S. N.; MU, Y; JACOB, J. T; RENO, J; SCOTT, J; WILSON, L. E.; VAETH, E; LYNFIELD, R; SHAW, K. M; VAGNONE, P. M; BAMBERG, W. M.; JANELLE, S. J.; DUMYATI, G; CONCANNON, C; BELDAVS, Z; CUNNINGHAM, M. C. M; PHIPPS, E. C.; KENSLOW, N; TRAVIS, T; LONSWAY, D; RASHEED, K; LIMBAGO, B M.; KALLEN, A. J. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013. **Journal of American Medical Association**, v. 314, n. 14, p. 1479-1487, 2015.

HINRICHSEN, S. L. Biossegurança e controle de infecções: risco sanitário hospitalar. Rio de Janeiro: Medsi. 2ª ed. 2013.

HLOPE, S. T; MCKERROW, N. H. Hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in a paediatric intensive care unit. **South African Journal of Child Health**, 8 (4), pp. 125-128, 2014.

IKONEM, R. S.; MIETTINEM, A.; GROONOS, P. Bacteriological quality control in a human milk bank. **Klin Pädiatr**. v. 194, p. 295-297, 1982.

KALITA, A; HU, J; TORRES, A. Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. **Curr Opin Infect Dis** v. 27, n. 5, p. 459–64, 2014.

KIM E.S; HOOPER, D.C. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. **Infection & chemotherapy**, 46(4):226-38, 2014.

KNOTHE, H; SHAH, P; KRCMERY, V; ANTAL, M; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-7, 1983.

LAWLOR, M. S; HANDLEY S.A; MILLER, V.L. Comparison of the host responses to wild-type and cpsB mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. **Infect Immun** 74:5402–5407, 2006.

LARANJEIRA, P. F. M; LARANJEIRA, A.C.M; PERCHES, R; MASCARENHAS, M.L.C. Perfil das infecções de origem tardia em uma unidade de terapia intensiva neonatal. **Resid Pediatr.**;8(2):77-81, 2018.

LI, X. Z; PLESIA, T. P; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, Abril, 28(2):337-418, 2015.

LIRA, B. F. **Qualidade da fração lipídica do leite humano ordenhado e processado.** Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

MACEDO, E. R; FERNANDES, M. R; AMORIM, M. A; LIMA, T. L; DE CARVALHO, L. R.. Epidemiological profile of acute diarrhea diseases notified in the municipal hospital of Una-BA in the period from 2013 to 2014. **Estácio Saúde**, 7 (2), 25-30, 2018.

MAIA, P. R. S.; ALMEIDA, J. A. G.; NOVALE, F. R.; SILVA, D. A. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano: gênese e evolução. **Rev. Bras. Saúde Materno Infantil**, Recife, v.6, n.3. p. 285-292, jul/set., 2006.

MARQUES, R.F.S.V; LOPES, F.A.; BRAGA, A.P. Growth of exclusively breastfed infants in the first 6 months of life. **J. Pediatr. (Rio J.)**. Porto Alegre , v. 80, n. 2, p. 99-105, Abr. 2004.

MARTINEZ, J., et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **Int. Microbiol.** v. 7, n. 4, p. 261-8, 2004.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G; PITOUT, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 28. n. 3, p. 565- 91, 2015

MENEZES, G. **Avaliação dos procedimentos higiênico-sanitários utilizados durante a coleta domiciliar e o transporte do leite humano ordenhado.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

MENEZES G.; CAVALCANTI L.L.; OLIVEIRA PINTO R.C.; ABDALLAH, V.O. Evaluación de la recolección domiciliar feita por un banco de leche humana de un hospital universitario de Brasil. **Salud Publica Mex.** 2014.

MOURA, M. R S; ALMEIDA L; MELLO, M. J. G; CALÁBRIA, W. B; GERMANO, E. M; MAGGI, R. R. S; CORREIA, J. B. The frequency of *Escherichia coli* and its sensitivity to antimicrobials in children aged under five years admitted to hospital for treatment of acute diarrhea. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, 12 (2), pp. 173-182, Junho 2012.

MODESTO, E. N.; BRITO, D. V. D. Infecções relacionadas à assistência à saúde em recém-nascidos de alto risco: perfil de resistência dos bacilos Gram negativos. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 7, p. e517, 11 mar. 2019.

MUTHUKUMARAN, N. Mortality profile of neonatal deaths and deaths due to neonatal sepsis in a tertiary care center in southern India: a retrospective study. **International Journal of Contemporary Pediatrics**, 8;5:1583, 2018.

MURRAY, P.; ROSHENTAL, P.R.; PFALLER, K. S. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro. 7ª ed. Guanabara Koogan, p. 258-271, 2014.

MUSSI-PINHATA, M. M.; DO NASCIMENTO, S. D. Infecções neonatais Hospitalares. **Jornal de Pediatria**, v. 77, Supl. 1, 2001.

NOBRE, C. G.; COELHO, R. C.; SILVA, N. M; DINIZ, Y. B.; GUERRA, R. C. Análise microbiológica do leite humano cru do banco de leite de um hospital de Araguaína-TO. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.8, n.2, Pub.8, Agosto 2015

NODARI, C. S. **Avaliação dos mecanismos adquiridos de resistência a antimicrobianos em Enterobactérias produtoras de carbapenemases por sequenciamento de nova geração**. Porto Alegre. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 5, p. 411-2, 2012.

NOVAK, F.R. et al. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n.3, p. 713-717, mai./ jun. 2001.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Teste alternativo para a detecção de coliformes em leite humano ordenhado. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 587-591, maio/ jun. 2002.

OLIVEIRA, M. I. C. et al. Manual de capacitação de multiplicadores na Iniciativa Unidade Básica Amiga da Amamentação. Rio de Janeiro: **Fiotec**, v. 1. p 215, 2006.

OLIVEIRA, C. B. S; DANTAS, V. C. R., MOTTA, N. R, AZEVEDO, P. R. M; MELO, M. C. N.Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **J Bras Patol Med Lab**. v. 47. n. 6. p. 589-594, dez 2011.

OTEO, J.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M.; CAMPOS, J.. Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. **Current Opinion in Infectious Diseases** n. 23, p. 320 – 26, 2010.

PACZOSA, M.K; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiol Mol Biol Rev**. Jun 15;80(3):629-61, 2016.

PAIXÃO, L.A.; CASTRO, F. F. S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 85-96, jan./jun. 2016.

PAN, Y-J, FANG, H-C, YANG H-C, LIN T-L, HSIEH P-F, TSAI F-C, KEYNAN Y, WANG J-T. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. **J Clin Microbiol** 46:2231–2240, 2008.

PAPP-WALLACE, K.M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M.A.; BONOMO, R.A. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrob Agents Chemother**. 55(11): 4943–4960, 2011.

PARISH, A.; BATHIA, J. Feeding Strategies in the EBLW Infantil. **Journal of Perinatology**, New York, v. 28, p. S18 – S20, 2008.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **The American journal of medicine**, 2006. DOI: 10.1016/j.amjmed.2006.03.013

PINHEIRO, M; NICOLETTI, C; BOZSZZOWSSK, I; PUCCINI, D; RAMOS, S. Infecção hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: há influência do local de nascimento? **Rev Paul Pediat**;27(1):6-14, 2009.

PORTA, A;PAROLA L. Escherichia Coli Early Onset Sepsis OPEN in Term Newborns: What's New. **SM Journal of Infect Dis**.; 2(1): 1006, 2017.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, 3 (9), pp. 1-7, 2012.

POMAKOVA, D.K; HSIAO, C.B; BEANAN, J.M; OLSON, R; MACDONALD, U; KEYNAN, Y; RUSSO, T.A. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 31:981–989, 2012.

RADICE, M. et al. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 2, p. 602-4, 2002.

RECHIA, F. P. N. S; CHERUBIM, D. O; PAULA, C.C; PADOIN, S.M.M. Fatores que interferem na doação de leite humano: revisão integrativa. **Cogitare Enferm**, 21(3), 01-11, 2016.

ROBBINS, S. T.; BEKER, L. T. Infant feedings: guidelines for preparation of formula and breast-milk in health care facilities. **Chicago: American Dietetic Association**. 122 p, 2004.

SANTOS, T. G. S. **Patotipagem, tipagem filogenética, determinação de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* uropatogênica**. Jataí. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde. Universidade Federal de Goiás, 2018.

SEIBERT, G; HÖRNER, R; MENEGHETTI, B. H; RIGHI, R. A; FORNO N. L. F; SALLA, A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein**, São Paulo, v. 12, n. 3, p.282-286, set. 2014.

SCARPATE, E. D; COSSATIS, J. J. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -Lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde & Ambiente em Revista**, 4(1), pp.1-11, 2009

SILVA, V. G. **Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção para Boas Práticas**. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança) – Instituto Fernandes Figueira/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J Bras Patol Med Lab**. v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012

SERAFINI, A. B.; *et. al.* Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Rev. Saúde Pública**, v.37, n.6, p.775-9, 2003.

SEIBERT, G. Nosocomial infections by *K. pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein**, 12(3), pp. 282-286, 2014.

SIMÕES, C. M. S. B. **Infeções Hospitalares Bacterianas no Século**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências da Saúde) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

SNEDEKER, K; SHAW, O.J; LOCKING, M.E; PRESCOTT, R Primary and secondary cases in *Escherichia coli* 0157 outbreaks: a statistical analysis. **BMC Infect Dis**, 9: 144, 2009.

SPURBECK, R. R; DINH, P.C , Walk, S. T; Stapleton, A. E; Hooton, T.M; Nolan, L.K; Kim, K.S; Johnson, J.R; Mobley, H.L. *Escherichia coli* isolates that carry vat, fyuA, chuA, and yfcV efficiently colonize the urinary tract. **Infection and Immunity**, 80 (12), pp. 4115-4122, 2012.

STOLL, B. J. The global impact of neonatal infection. **Clin Perinatol**, v. 24, p.1-21, 2002.

TURTON, J. F; PERRY, C; ELGOHARI, S; HAMPTON, C. V. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of Medical Microbiology**, 59(5), 541–547, 2010.

TYSON, J.; EDWARDS, W.; ROSENFELD, A.; BEER, A. Collection methods and contamination of bank milk. **Arch Dis Child**. v.57, p.396-398, 1982.

VIEIRA, L. A. *et al.* Colonização Intestinal de Recém Nascidos por Enterobactérias Multiresistentes a antimicrobianos em Unidade Neonatal. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 2, p. 83-90; 1999.

VUOTTO, C; FRANCESCA, L; BALICE, M. P; DONELLI, G; VARALDO, P. E. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, 3 (3), pp. 743–758, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – The optimal duration of exclusive breastfeeding – Report of an Expert Consultation – Geneva, Switzerland, Março, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Indicators for assessing infant and young child feeding practices: conclusions of a consensus meeting held 6–8 November 2007 in Washington D.C., USA. Geneva: **WHO**; 2008

XIE, Y; KIM, K.J; KIM, K.S. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 42:271–279, 2004.

YEH, K-M; KURUP, A; SIU, L.K; KOH, Y.L; FUNG, C-P; LIN, J-C; CHEN, T-L; CHANG, F-Y; KOH, T-H. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. **J Clin Microbiol** 45:466–471, 2007.

YEH, K.M; LIN, J.C; YIN, F.Y; FUNG, C.P; HUNG, H.C; SIU, L.K; CHANG, F.Y.
Revisiting the importance of virulence determinant magA and its surrounding genes in
Klebsiella pneumoniae causing pyogenic liver abscesses: exact role in serotype K1 capsule
formation. J Infect Dis **201**: 1259–1267, 2010.

CAPÍTULO 1

Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de cepas de *Klebsiella* spp. isoladas em amostras de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Esau Matos em Vitória da Conquista (BA).

Nívea Nara Novais Andrade¹, Luana Andrade Mendes Santana¹, Lucas Santana Coelho², Thiago Macêdo Lopes Correia¹, Cláudio Lima Souza¹, Lucas Miranda Marques¹, Márcio Vasconcelos Oliveira¹.

¹Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brazil.

²University of Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Brazil.

Multidisciplinary Institute of Health: Rua Rio de Contas, 58 – Quadra 17 – Lote 58, Bairro Candeias – CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista, BA, Brazil.

*Address correspondence to: Phone: +55 77 3429-2710. E-mail: marciomvof@gmail.com (Márcio Vasconcelos Oliveira)

Resumo

Os Bancos de Leite Humano (BLHs) são uma estratégia para garantir a nutrição de recém-nascidos (RNs) que não podem obter o leite humano (LH) através da amamentação direta, através da doação de leite humano ordenhado (LHO) por doadoras. A coleta do LHO pode ser realizada em domicílio e as condições higiênico-sanitárias utilizadas desde a ordenha até o processamento devem seguir protocolos para evitar a contaminação microbiológica. Dentre as bactérias que podem contaminar o LHO destacam-se espécies de *Klebsiella* spp por serem importantes causadores de infecções neonatais como meningite, pneumonia e sepse. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar a patogenicidade e perfil de resistência à antibióticos de isolados de *Klebsiella* spp. em amostras de doadoras provenientes do BLH em Vitória da Conquista e correlacionar a presença microbiana com as condições higiênico-sanitárias das participantes do estudo. Foram coletadas amostras de 30 doadoras cadastradas no BLH. Foram encontradas espécies de *Klebsiella* em 36,6% (n=11). Dessas, em 36,6% (n=4) o micro-organismo foi isolado apenas nas amostras cutâneas, 27,3% (n=3) apenas no leite humano ordenhado cru (LHOC), 18,2% (n=2) com resultados positivos nas amostras cutâneas e de LHOC e 9,1% (n=1) com crescimento em amostras cutâneas, LHOC e leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP). Através de detecção do gene *pehB* por PCR 73,4% (n=11) foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae*. Foi realizado o antibiograma com recomendação do CLSI 2017 em todas as cepas: 42,8% (n=6) apresentaram resistência a Ampicilina e Sulbactam e 35,7% (n=5) a Amoxicilina e Ácido Clavulânico. Os isolados também foram submetidos ao teste de detecção fenotípica de ESBL por disco-aproximação, 23,1% (n=3) apresentaram resultados positivos. Para o teste de Hodge modificado todas as cepas foram negativas. Foi utilizada a técnica qPCR para detecção de genes de ESBL: SHV-1, TEM, CTXM-1 e CTXM-2 e os genes de virulência *rmpA* e *wcaG*. 40,0% (n=6) apresentaram o gene *rmpA*, 41,6% (n=5) apresentaram o gene *wcaG*. Nenhuma cepa apresentou o gene CTXM-2, 41,6% (n=5) apresentaram o gene SHV-1, 41,6% (n=5) apresentaram o gene CTXM-1 e 53,3% (n=8) apresentaram o gene TEM.

ABSTRACT

Human Milk Banks (HMBs) is a strategy to ensure newborns nutrition who cannot get human milk (HM) through direct breastfeeding. The collection of expressed human milk (EHM) is held by donor and can be done at home. The sanitary conditions must follow protocols used to prevent microbiological contamination. Among the bacteria that can contaminate the EHM stand out species of *Klebsiella* spp to be important causes of neonatal infections such as meningitis, pneumonia and sepsis. Thus, this study aimed to identify and characterize the pathogenicity and resistance antibiotics profile of the isolates of *Klebsiella* spp.in samples from donors from the HMB in Vitória da Conquista and to correlate the microbial presence with the hygienic-sanitary conditions of the study participants. Samples were collected from 30 registered donors at the BLH. *Klebsiella* species were found in 36.6% (n = 11). Of these, 36.6% (n = 4) micro-organism was isolated only in skin samples, 27.3% (n = 3) only in human milk raw, 18.2% (n = 2) with positive results in skin samples and human milk raw, and 9.1% (n = 1) an increase in skin samples, human milk raw and pasteurized human milk. Through detection of the gene *pehB* by PCR 73.4% (n = 11) were identified as *Klebsiella pneumoniae*. Was performed antibiogram with the recommendation of the CLSI 2017 and: 42, 8% (n = 6) were resistant to ampicillin and sulbactam and 35.7% (n = 5) to amoxicillin and clavulanic acid. The isolates were also submitted to testing phenotypic detection of ESBL-disk approach, 23.1% (n = 3) were positive. For Hodge test modified all strains were negative. qPCR was used for detection of ESBL genes: SHV-1, TEM-1, CTXM-1 and CTXM-2 and the virulence genes *rmpA* and *wcaG*. 40.0% (n = 6) showed the *rmpA* gene, 41.6% (n = 5) had the *wcaG* gene. No strain showed the CTXM-2 gene, 41.6% (n = 5) had the SHV-1 gene, 41.6% (n = 5) had the CTXM-1 gene and 53.3% (n = 8) showed TEM gene.

Introdução

Os estoques de leite humano ordenhado (LHO) distribuídos pelos Bancos de Leite Humano (BLH) são mantidos por doadoras voluntárias. O LHO é fundamental para a alimentação de recém-nascidos (RNs), em sua maioria prematuros e internados, que por diversos fatores não podem ser nutridos por amamentação direta. Como forma de otimizar as doações, a coleta do LHO pode ser realizada na residência das doadoras. As etapas posteriores de transporte, recebimento, estocagem, degelo, seleção, pasteurização, controle de qualidade

microbiológica do leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP); estocagem do LHOP e distribuição são realizadas exclusivamente no BLH (BRASIL, 2008).

Um dos problemas mais relevantes nos BLHs é o controle microbiológico do LHO, pois a constituição química do mesmo favorece de modo importante o crescimento bacteriano de micro-organismos patogênicos que podem ser adquiridos por contaminação externa e ocasionar importantes infecções, sobretudo em recém-nascidos (TYSON, et al, 1982), (ALMEIDA, et al, 1999) (HINRICHSEN, 2004) (MUSSI-PINHATA, 2001).

Algumas espécies de Enterobactérias são encontradas com frequência no leite humano. Dentre elas, espécies de *Klebsiella* spp. tem grande importância clínica em ambiente hospitalar (FALAGAS et al., 2014), (GUH et al., 2015), sobretudo em unidades neonatais por serem comumente patogênicos para os neonatos (PORTA e PAROLA, 2017) e apresentarem mecanismos de resistência a antimicrobianos (SEIBERT, 2014). Além disso, a ingestão de cepas patogênicas de *Klebsiella* spp. por RNs pode alterar a constituição da microbiota intestinal em processo de formação e pode ser uma etapa anterior ao estabelecimento de infecções, fenômeno de reconhecida importância no ambiente hospitalar (PAIXÃO e CASTRO, 2016).

A espécie *Klebsiella pneumoniae* é responsável por infecções pediátricas relevantes em recém-nascidos prematuros sendo o quarto agente patogênico mais comum em quadros sépticos no período neonatal (SIMÕES, 2016). Pode também provocar infecção das vias biliares, do ouvido médio, dos seios paranasais, peritonite, conjuntivite e meningite (HLOPE & MCKERROW, 2014) (ALMUNEEF et al, 2017) (COSTA e SILVA, 2018), (CUNHA et al.,2014), (DJORDJEVIC, 2015).

O fator de virulência de *Klebsiella* spp. mais estudado é a cápsula. Cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* produzem uma cápsula hipermucoviscosa. (YEH et al, 2007) (PAN et al, 2008). O gene plasmidial *rmpA* (regulador do fenótipo mucoide A; AB289644) é o responsável por conferir o fenótipo hipermucoso a *Klebsiella pneumoniae*, por aumento produção de polissacarídeos capsulares (DERAKHSAN, 2016). Também foi evidenciada que a presença do desoxiaçúcar fucose na hipercápsula está associada ao escape da fagocitose pela bactéria. O gene *wcaG* está envolvido na síntese de fucose e, portanto, está associado à virulência de *K. pneumoniae* (YEH et al, 2010).

Cepas de *Klebsiella* spp. também possuem a capacidade de funcionar como um reservatório de genes de resistência, podendo transferi-los para outras bactérias através de

plasmídeos. A resistência apresentada por essa bactéria a antimicrobianos nos últimos anos se tornou um problema de saúde pública e preocupação em todos os campos da saúde (GIAMARELLOUH, 2010).

Um ponto de urgência clínica tem sido a alta prevalência de ESBL em *Klebsiella* spp. (D'ANGELO et al, 2016). No Brasil, um estudo realizado na cidade de Santos, São Paulo evidenciou que 55% dos isolados de *K. pneumoniae* de amostras biológicas no ambiente de um hospital produziam ESBL (ANDRADE, 2017), resultando em falha terapêutica e surtos por cepas resistentes no ambiente hospitalar, o que tem alto impacto na saúde pública diante das características de patogenicidade e endemidade da bactéria (COSTA e SILVA JUNIOR, 2017).

São poucos os estudos que avaliam a qualidade microbiológica do LHO, e menos ainda os que se propõem a identificar e caracterizar as cepas encontradas, pensando na possibilidade de micro-organismos possivelmente infectantes para os neonatos internados no ambiente hospitalar serem veiculados pela rota de coleta, transporte, manuseio e distribuição do LHO. Diante do exposto o presente estudo objetivou identificar e caracterizar a patogenicidade e perfil de resistência à antibióticos de isolados de *Klebsiella* spp. em amostras de doadoras provenientes do Banco de Leite Humano do Hospital Esaú Matos em Vitória da Conquista, Bahia e correlacionar a presença microbiana com as condições higiênico-sanitárias das participantes do estudo.

Materiais e Métodos

Desenho do estudo, local, período:

Trata-se de um estudo de corte transversal realizado com doadoras cadastradas no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos (BLH-HMEM). As coletas foram realizadas entre o período de março e agosto de 2018.

Seleção de participantes:

Foram convidadas a participar do estudo todas as doadoras com volume de doação semanal de LHO igual ou superior a 400 mL, esse critério foi utilizado visto que no BLH-HMEM volumes inferiores a 400 mL são submetidos a 'pool' com amostras de outras doadoras, levando a perda da rastreabilidade dos resultados. Também foram excluídas do estudo doadoras com lesões em mãos e/ou região mamilo areolar.

Inicialmente foi realizado contato telefônico e, às doadoras que aceitaram, foi realizada visita domiciliar para apresentação detalhada do projeto e solicitação de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1)

Entrevista e coleta de amostras

As doadoras foram submetidas a uma entrevista utilizando como instrumento um questionário estruturado que versava sobre variáveis relacionadas aos hábitos higiênico-sanitários da coleta de leite humano e variáveis sociodemográficas (Apêndice 2).

Foi solicitado que a participante se preparasse como comumente realiza antes da ordenha e foi colhido pela pesquisadora um swab único das mãos e região mamilo-areolar. Em seguida foi fornecido a doadora um frasco estéril para coleta de um volume aproximado de 2mL do LHO. Para as doadoras que utilizavam bomba de sucção para retirar o leite orientou-se a retirada da alíquota utilizando o equipamento.

Os materiais foram identificados com códigos sequenciais para rastreabilidade dos resultados e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde – UFBA para análises. O swab foi transportado em caixa térmica isolada à temperatura ambiente, e a amostra de LHO em caixa térmica refrigerada.

Foi solicitado que a participante fixasse no frasco estéril de LHO, que seria preenchido e enviado ao BLH, uma etiqueta do estudo. Esse material foi encaminhado ao BLH pela rotina interna de transporte do setor e foi submetido ao controle de qualidade rotineiro. Após o

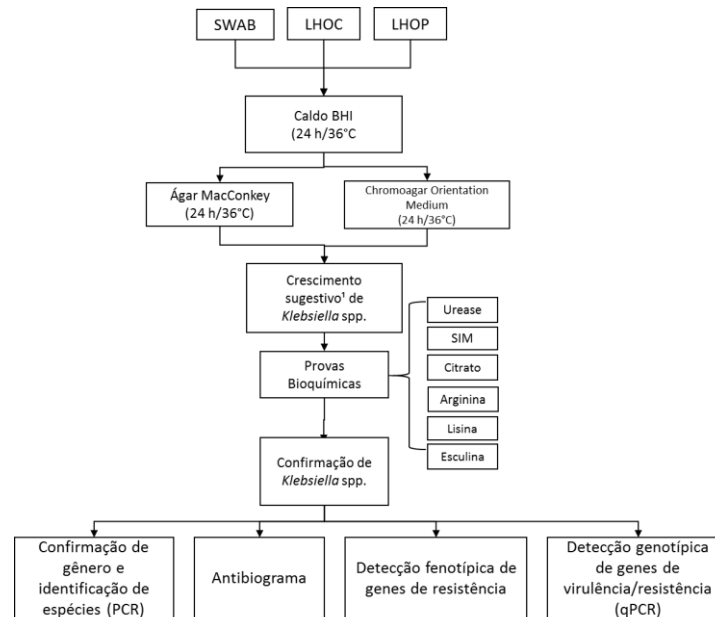
processo de pasteurização foi extraída uma alíquota de 2 mL pelo responsável pelo controle de qualidade do LHO no BLH. Essa alíquota foi acondicionada em frasco de vidro estéril e encaminhada ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Pesquisa – UFBA em caixa térmica refrigerada.

Aspectos éticos:

Esse estudo fez parte de um projeto maior denominado “Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras de Leite Humano no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA)”. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Multidisciplinar em Saúde IMS/UFBA, CAAE: 80800717.8.0000.5556 – Parecer n°: 2.475.023. O estudo seguiu todos os preceitos necessários, conforme estabelece resolução 466/2012.

Análises microbiológicas

Todas as amostras foram inicialmente inoculadas em meio de enriquecimento Brain Heart Infusion Broth (BHI) - HIMEDIA® por 24 horas a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e posteriormente repicadas em placas com meio Ágar MacConkey - HIMEDIA® e Difco Chromoagar Orientation – BD®, as colônias sugestivas de *Klebsiella* spp. foram submetidas a provas bioquímicas. A identificação das colônias isoladas seguiu o fluxo apresentado no fluxograma 1. A utilização concomitante do meio MacConkey e Chromagar Orientation Medium permitiu a identificação de outras espécies nas amostras, além das de interesse do estudo, esses resultados também foram registrados.



Fluxograma 1: Isolamento, identificação e caracterização de cepas de *Klebsiella* spp. isoladas do estudo. ¹Crescimento sugestivo de *Klebsiella* spp.: Ágar MacConkey: colônias mucoides, fermentadoras de lactose. ChromAgar Orientation Medium: vide instruções do fabricante.

Confirmação de gênero e identificação de espécies de *Klebsiella* isoladas

As amostras que foram identificadas por técnicas de microbiologia convencional como pertencentes ao gênero *Klebsiella* spp. foram submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação do gênero e identificação das espécies mais comuns: *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*.

O DNA foi extraído através do método de fervura descrito por Fan e colaboradores (1995) e submetido à técnica de PCR para identificar os genes *gyr A* (confirmação do gênero *Klebsiella*), *peh X* (identificação da espécie *Klebsiella oxytoca*) e *rpoB* (identificação da espécie *Klebsiella pneumoniae*) utilizando os primers definidos no Quadro 1.

A reação foi preparada para um volume final de 50 μ L por tubo, compreendendo: 5 μ L de tampão PCR, 1,5 μ L de $MgCl_2$; 8 μ L de dNTP, 1 μ L de cada um dos primers, 100 ng de DNA genômico e 0,25 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Brasil).

Em um termociclador foram feitas as amplificações, obedecendo a uma desnaturação inicial de 95° C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos térmicos de desnaturação consistindo de 1 minuto a 95° C cada, 1 minuto a 55° C para anelamento, 2 minutos a 72° C, concluindo com uma extensão final a 72° C por 10 minutos para cada um dos genes (CHANDER, 2011).

Os produtos das ampliações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0%, corados com 2,5 µl de brometo de etídio (10 mg/mL) por 40 minutos, visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Um marcador de peso molecular “DNA Ladder de 100 pb” (Invitrogen®, Brasil) foi utilizado como padrão para o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados, descritos no quadro 1. Como controle positivo da reação foi utilizada cepa *K. pneumoniae* ATCC700603.

Quadro 1: Primers específicos utilizados nas reações de PCR em cepas de *Klebsiella* spp. isoladas no estudo, suas finalidades, tamanho e referência.

Gene	Sequência do Primer (5' → 3')	Tamanho do produto	Referência
rpoB	F: 5' CAACGGTGTGGTTACTGACG 3' R: 5' TCTACGAAGTGGCCGTTTTTC 3'	108 bp	Chander et al, 2011
pehX	F:5'GATACGGAGTATGCCTTTACGGTG 3' R:5'TAGCCTTTATCAAGCGGATACTGG 3'	343 bp	Chander et al, 2011
gyrA	F:5'CGCGTACTATACGCCATGAACGTA3' R: 5'ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG3'	441 bp	Brisse e Duijkren. 2001

Antibiograma

As amostras confirmadas como *Klebsiella* spp. foram submetidas a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos através do teste de difusão em ágar (BRASIL, 2010) e conforme recomendações do CLSI 2017. Os ensaios foram realizados a partir de suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland em placas de Petri contendo ágar Difco™ Mueller Hinton – Becton Dickinson®. Os carbapenêmicos foram incluídos além da lista do CLSI, visto que a resistência de enterobactérias aos antimicrobianos dessa classe é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, particularmente pela elevada mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas (NORDMAN, 2012).

Detecção Fenotípica de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

Todas as cepas de *Klebsiella* spp. isoladas foram submetidas ao teste de detecção fenotípica de ESBL através da metodologia de disco-aproximação (JARLIER, 1998). Foram considerados positivos para produção de ESBL as cepas em que houve uma deformação dos halos de inibição próximos ao disco do inibidor de beta-lactamase ou aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição (zona fantasma) entre o inibidor e um dos substratos beta-lactâmicos.

Detecção de genes de virulência e resistência por Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para todos os isolados identificados como *Klebsiella* spp. foram pesquisados os seguintes genes: (1) de virulência: *rmpA*, envolvido na regulação da síntese extracapsular de polissacarídeos e expressão de fenótipo hiper mucoviscoso e *wcaG*, associado ao aumento da capacidade da bactéria de escapar de fagocitose por macrófagos; (2) de resistência associados a produção de ESBLs dos tipos SHV-1, TEM-1, CTXM-1 e CTXM-2.

O DNA das cepas isoladas foi extraído pelo método de fervura descrito por Fan e colaboradores. (1995). A técnica de qPCR foi realizada utilizando o mastermix constituído do sistema SYBR Green® (Qiagen, EUA) e os primers específicos para cada um dos genes, descritos no Quadro 2. O volume para cada reação foi de 6 microlitros de água ultrapura tipo I, livre de DNase - LGC Biotecnologia®, 10 microlitros de SYBR Green®, 1 microlitro de cada primer (forward e reverse) e 2 microlitros de DNA na concentração de 100 ng/μL.

As amplificações foram feitas em duplicata e a termociclagem foi realizada no termociclador Step One Plus (Applied Biosystem, EUA), submetidas as condições de ciclagem definidas por Gomes et al. 2018: 40 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 15 segundos e anelamento / extensão a 60 ° C por 60 segundos. Posteriormente, foi realizada análise da curva de melting para verificar a amplificação inespecífica e/ou formação de dímeros de primers. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram amplificação anterior ou igual ao CT 35.

Quadro 2: Sequência dos primers utilizados para qPCR em cepas de *Klebsiella* spp isoladas no estudo e suas referências.

Gene alvo	Sequência do iniciador (5' - 3')	Referências
<i>blaSHV-1</i>	F: 5' TCAGCGAAAAACACCTTG 3' R: 5' TCCCGCAGATAAATCACC 3'	Dehshri et al, 2018
<i>blaTEM</i>	F: 5' CTTCTGTTTTTGTCTCACC 3' R: 5' AGCAATAAACAGCCAGC 3'	Dehshri et al, 2018
<i>blaCTXM-1</i>	F: 5' GACGATGTCCTGGCTGAGC 3' R: 5' AGCCGCCGACGCTAATACA 3'	Dehshri et al, 2018
<i>blaCTXM-2</i>	F:5'GCGACCTGGTTAACTACAATCC3' R:5'CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC 3'	Dehshri et al, 2018
<i>rmpA</i>	F: 5' ACTGGG CTA CCT CTG CTT CA 3' R: 5' CTT GCA TGA GCC ATC TTT CA 3'	Derakhshan et al, 2016
<i>wcaG</i>	F: 5' GGT TGG GTC AGC AAT CGT A 3' R: 5' ACT ATT CCG CCA ACT TTT GC 3'	Derakhshan et al, 2016

Análise de dados:

Todos os dados obtidos no estudo foram registrados em planilha no Microsoft Excel 2007 e em seguida foi realizada a análise descritiva utilizando o programa estatístico EPI INFO (versão 3.5.1.). Para a comparação de frequências foi utilizado o Teste de qui-quadrado, considerando índice de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

Trinta doadoras concordaram participar do estudo, entre os meses de março a agosto de 2018. A maior parte das doadoras tinha idade inferior a 30 anos, com renda familiar média superior a dois salários mínimos, que para o período do estudo era de R\$ 954,00, tinha companheiro, apenas um filho e com nível de escolaridade maior ou igual ao ensino médio completo.

As doadoras foram convidadas a responder um questionário acerca da frequência da realização dos procedimentos higiênicos-sanitários utilizados para coleta do LH, os dados com maior relevância do questionário estão descritos na Tabela 1. A maioria das participantes informou que sempre higienizava as mãos com água e sabão ou álcool gel 70% antes da coleta, mas 60% (n=18) não verificavam sempre o tamanho das unhas e cortavam quando necessário antes da coleta. Todas as amostras de swab colhidas das mãos e da região mamilo-areolar antes da ordenha apresentaram crescimento de micro-organismos, em 66,7% (n=20) houve crescimento de mais de um micro-organismo na mesma amostra.

Os resultados obtidos após crescimento em meio cromogênico e Mac Conkey seguido de provas bioquímicas foram suficientes para verificação de micro-organismos além daqueles de interesse do presente estudo, portanto foi possível identificar que nas amostras colhidas das regiões anatômicas a maior prevalência foi de *Staphylococcus aureus*, (90%, n=27), seguido de *Enterococcus* spp, (26,7%, n=8) e *Klebsiella* spp, (23,3%, n=7) sendo o bacilo gram-negativo mais frequente nas amostras de swab.

Entre as doadoras em que houve isolamento de *Klebsiella* spp no swab a maioria informou sempre realizar a higienização das mãos com água e sabão ou álcool 70% antes da ordenha, 71,4% (n=5) disseram sempre lavar os seios antes da coleta do leite, mas apenas 14% (n=1) indicaram sempre ter o cuidado de manter as unhas em tamanho adequado.

Sobre os critérios adotados no momento da ordenha a maioria das doadoras afirmou sempre prender os cabelos, utilizar máscara descartável e evitar conversar durante o procedimento da ordenha. Quando questionadas sobre a ação de desprezar o primeiro jato antes da coleta do LH apenas 53% (n=16) disseram sempre realizar esse procedimento. A maior parte das doadoras, 80% (n=24) utilizam bomba tira-leite para auxílio na ordenha. Todas as doadoras que utilizavam bomba informaram que realizam a higienização do instrumento sempre antes de utilizar.

Todas as amostras de LHOC incubadas também tiveram crescimento bacteriano. Aproximadamente 73% (n=22) tiveram crescimento de mais de um micro-organismo na mesma placa. Assim como no swab a maior prevalência foi de *S. aureus*, 86,7% (n=26) seguido de *Klebsiella* spp., 23,3% (n=7) e *Streptococcus* não-hemolítico, 23,3% (n=7).

Avaliando apenas as sete doadoras com crescimento de *Klebsiella* spp. no LHOC, alguns dados merecem destaque como o fato de 43% (n=3) dessas também apresentarem crescimento de *Klebsiella* na amostra de Swab e o fato da ordenha ser em sua maioria através da utilização de bomba (86%, n=6). Aproximadamente 58% (n=4) das doadoras com crescimento positivo para *Klebsiella* spp. no LHOC informaram raramente ou nunca desprezar o primeiro jato de leite antes da ordenha.

Todas as doadoras informaram utilizar para armazenamento do LHO apenas os frascos estéreis fornecidos pelo BLH e também relataram armazenar o LHO imediatamente na geladeira após a ordenha.

Durante o período de coleta das amostras cinco participantes apresentaram volume de LHO doado na semana da pesquisa inferior ao necessário para pasteurização sem realização de pool com amostras de outras doadoras, configurando 5 perdas de LHOP para o estudo, portanto foram obtidas 25 amostras de LHP. Dessas, 36% (n=9) tiveram crescimento bacteriano. Todos os resultados positivos nas amostras de LHOP foram imediatamente comunicados a bioquímica responsável do BLH e todos os frascos pasteurizados referentes a essas amostras foram descartados. Das amostras positivas de LHOP a maior prevalência também foi de *S. aureus* (44,4%, n=4), seguido de *Corynebacterium* (22,2%, n=2) e *Klebsiella* spp. (11%, n=1).

A amostra com isolado de *Klebsiella* spp. representa 4% das amostras totais de LHOP e 11% das amostras de LHOP com crescimento positivo. Essa cepa foi isolada de uma doadora que também teve crescimento de *Klebsiella* spp. nas amostras de swab e de LHOC. Essa doadora informou no questionário raramente conferir o tamanho das unhas e nunca desprezar o primeiro jato antes da coleta e utilizava bomba tira-leite para coleta do LHO.

Os dados descritivos dos questionários socioeconômicos e das condições higiênico-sanitárias utilizadas na coleta do LHO com maior relevância para o estudo estão apresentados na Tabela 1 e todos os resultados de micro-organismos isolados nas amostras colhidas estão na Tabela 2.

Tabela 1: Análise Descritiva de aspectos socioeconômicos e condições higiênico-sanitárias de coleta das doadoras de BLH integrantes do estudo. Vitória da Conquista. n=30

Condições socioeconômicas		
	N	(%)
Faixa etária		
Até 30 anos	19	63,3
Superior a 30 anos	11	36,7
Estado conjugal		
Com companheiro	20	66,7
Sem companheiro	10	33,3
Renda familiar		
Menos de 2SM**	9	30,0
Acima de 2 SM**	21	70,0
Quantidade de filhos		
Um filho	16	53,3
Dois ou mais filhos	14	46,7
Condições Higiênico-sanitárias		
	N	(%)
Forma de realização da ordenha		
Bomba manual/elétrica	24	80,0
Ordenha Manual	6	20,0
Frequência de higienização da bomba¹		
Sempre antes de usar	24 ²	100,0 ²
Raramente/Nunca	0	0,0
Conferir tamanho das unhas e cortar quando necessário³		
Sempre	12	40,0
Raramente/Nunca	18	60,0
Desprezar o primeiro jato de leite⁴		
Sempre	16	53,3
Raramente/Nunca	14	46,7
Prender o cabelo com auxílio de touca descartável⁴		
Sempre	24	80,0
Raramente/Nunca	6	20,0

**Salário mínimo no período R\$ 954,00. ¹Pergunta realizada apenas para as doadoras que informaram utilizar bomba elétrica ou manual para a ordenha. ²N total de doadoras que realizaram a ordenha por meio de bomba elétrica ou manual ³Frequência de realização do procedimento antes da ordenha do LHO para o BLH. ⁴ Frequência de realização do procedimento durante a ordenha do LHO para o BLH.

Tabela 2: Distribuição dos Micro-organismos isolados em amostras de swab de região mamilo-aureolar e mãos, LHOC e LHOP das doadoras participantes do estudo.

SWAB – Mãos e Região Mamilo-aureolar¹		
Bactéria Isolada	N	%*
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	90,0
<i>Enterococcus spp.</i>	8	26,7
<i>Klebsiella spp.</i>	7	23,3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	10,0
<i>Streptococcus não-hemolítico</i>	3	10,0
<i>Streptococcus bovis</i>	3	10,0
<i>Corynebacterium</i>	3	10,0
<i>Streptococcus viridans</i>	1	3,3
Leite Humano Ordenhado Cru – LHOC²		
Bactéria Isolada	N	%*
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	86,7
<i>Klebsiella spp.</i>	7	23,3
<i>Streptococcus não-hemolítico</i>	7	23,3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5	16,7
Bacilo Gram-negativo Não-fermentador	4	13,3
<i>Enterococcus spp.</i>	4	13,3
<i>Streptococcus bovis</i>	4	13,3
<i>Corynebacterium</i>	1	3,3
Fungos	1	3,3
Outras <i>Enterobacterias</i>	1	3,3
Leite Humano Ordenhado Pasteurizado – LHOP³		
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	16,0
<i>Corynebacterium</i>	2	8,0
<i>Klebsiella spp.</i>	1	4,0
Bacilo gram-negativo não-fermentador	1	4,0
Outras Enterobactérias	1	4,0

*Porcentagem referente ao total de amostras analisadas (N=30 para SWAB e LHOC; N=25 para LHOP). ¹No swab 66,7% (n=20) das placas tiveram crescimento de mais de um micro-organismo. ²No LHOC 73,0% (n=22) tiveram crescimento de mais de um micro-organismo na mesma placa. ³No LHOP todas as amostras com resultado positivo (n=9) tiveram apenas um micro-organismo isolado em suas placas.

Identificação de cepas de *Klebsiella spp.*

Foram encontradas espécies do gênero *Klebsiella* em amostras de 11 doadoras de LHO do BLH de Vitória da Conquista, sejam elas de swab, LHOC e/ou LHOP, representando uma prevalência global de 36,6%.

No total foram obtidos 15 isolados de *Klebsiella* spp. das placas semeadas. Os resultados obtidos no meio cromogênico como colônias azuis e médias foram identificados como pertencentes ao complexo *Klebsiella*, *Enterobacter* ou *Serratia*, de acordo com orientações do fabricante, e a distinção entre essas espécies foi realizada através das provas bioquímicas. Todas as cepas identificadas no meio Chromoagar Orientation Medium foram confirmadas como pertencentes do gênero *Klebsiella* spp. pelas provas bioquímicas utilizadas, aliado ao crescimento no meio Mac Conkey.

Após o isolamento, as cepas foram submetidas a PCR convencional para confirmação do gênero *Klebsiella* spp. através da amplificação do gene *gyrA*. Os resultados demonstraram que todos os isolados possuíam o fragmento amplificado com tamanho de 441 bp.

Através das provas bioquímicas não foi possível classificar as espécies de *Klebsiella* isoladas no estudo, para isso foi utilizada também a técnica de PCR convencional para avaliação dos genes *rpoB* e *pehX*, o gene *rpoB* está presente nas cepas de *Klebsiella pneumoniae* e o gene *pehX* nas cepas de *Klebsiella oxytoca*. 73,3% (n=11) das cepas foram classificadas como pertencentes a espécie *Klebsiella pneumoniae*, em nenhuma cepa a banda referente ao gene *pehX* foi amplificada, sendo assim nenhum dos isolados faz parte da espécie *Klebsiella oxytoca*. Sendo assim, os 4 outros isolados fazem parte de outras espécies menos comuns.

É importante ressaltar que nas três doadoras que apresentaram *Klebsiella* spp. em mais de uma amostra: duas com isolados no swab e LHOC e uma com isolados nas três amostras (swab, LHOC e LHOP) na identificação molecular todas as cepas foram classificadas na mesma espécie: *Klebsiella pneumoniae*.

Antibiograma

Para todas as cepas de *Klebsiella* spp. isoladas foi realizado o antibiograma por disco-difusão seguindo os critérios do CLSI 2017. A distribuição dos resultados está apresentada na tabela 3. Nenhuma cepa apresentou halo de sensibilidade indicado como intermediário.

Tabela 3: Distribuição dos resultados dos antibiogramas realizados com as cepas de *Klebsiella* spp (n= 15) isoladas em amostras de doadoras do BLH do Hospital Municipal Esaú Matos, Vitória da Conquista, 2018.

Antimicrobiano	Resistente		Sensível	
	%	N	%	N
AMPI+SULB	40,0	6	53,4	8
AMOX+ CLAV	33,3	5	66,4	10
AMICA	0,0	0	93,4	14
CRX	0,0	0	100	15
PIPER	0,0	0	93,4	14
TETRA	0,0	0	93,4	14
ERTA	0,0	0	93,4	14
MERO	0,0	0	100	15
IMIP	0,0	0	100	15
NITRO	0,0	0	93,4	14

Siglas: AMPI+SULB = Ampicilina + Sulbactam; AMOX+CLAV = Amoxicilina + Clavulanato; AMICA = Amicacina; CRX = Cefuroxima; PIPER = Piperaciclina; TETRA = Tetraciclina; ERTA = Ertapenem; IMIP = Imipenem; NITRO = Nitrofurantoína.

Detecção fenotípica de ESBL

Método de Disco-aproximação

Entre as amostras de *Klebsiella* spp isoladas realizou-se o teste de indução da produção de ESBL pelo método de disco-aproximação, três cepas (20%) apresentaram resultados positivos para o teste, conforme representados na Figura 1, duas amostras de swab e uma amostra de LHOC de doadoras diferentes. Outras três amostras (20%) tiveram resultados inconclusivos para o teste, duas amostras (swab e LHOC) de uma mesma doadora e

amostra de LHOC de doadora distinta. A confirmação foi realizada através de detecção genotípica.

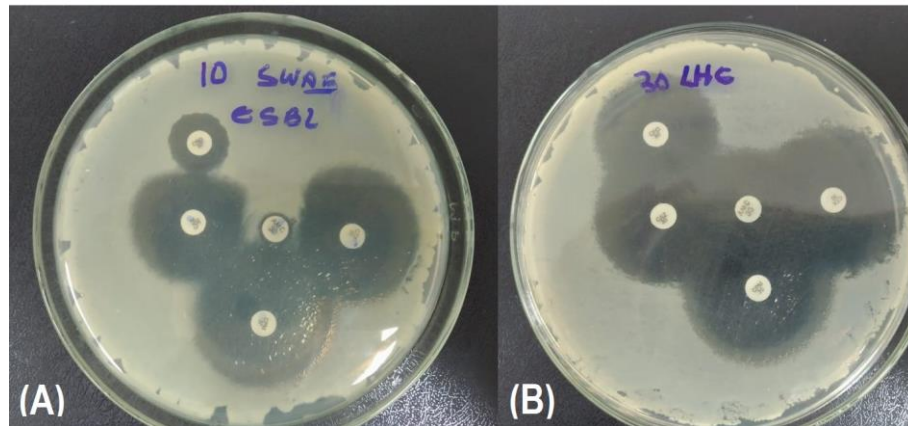


Figura 1: Resultados do teste de indução de ESBL em amostras de *Klebsiella* spp. (A) Cepa com resultado positivo para indução do gene ESBL. (B) Cepa com resultado negativo para indução do gene ESBL. Fonte: Acervo próprio.

Detecção de genes de resistência para ESBL

A análise dos genes SHV-1, TEM, CTXM-1 e CTXM-2 foi realizada em 12 amostras isoladas no estudo. Dessas, nenhuma cepa apresentou o gene CTXM-2, 41,6% (n=5) apresentaram o gene SHV-1, 41,6% (n=5) apresentaram o gene CTXM-1 e 66,6% (n=8) apresentaram o gene TEM. A distribuição dos resultados está representada na tabela 4.

Detecção dos genes de virulência *rmpA* e *wcaG*

A identificação dos genes *rmpA* e *wcaG* por qPCR foi realizada em 12 isolados do estudo. Desses, 50% (n=6) apresentaram o gene *rmpA* (equivalentes a 40% das amostras isoladas), sendo 2 amostras isoladas de swab, 3 amostras de LHOC e uma amostra de LHOP. Sobre o gene *wcaG*, 41,6% (n=5) o apresentaram em seu material genético, o equivalente a 33,3% de todos os isolados, sendo duas amostras de swab, 2 amostras de LHOC e uma amostra de LHOP. Todos os resultados da amplificação por qPCR estão na tabela 4.

Dentre as sete amostras amplificadas, quatro (57,1%) apresentaram os dois genes pesquisados. A única cepa isolada de LHOP apresentou os dois genes.

Tabela 4: Resultados de *cycle threshold* (Ct) para os genes *rmpA*, *wcaG*, TEM, CTXM-1 e CTXM-2 em cepas de *Klebsiella* spp isoladas do estudo através da técnica de qPCR.

AMOSTRA	<i>rmpA</i>	<i>wcaG</i>	<i>blaSHV-1</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaCTXM-1</i>	<i>blaCTXM-2</i>
C (-)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4L	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5S	ND	ND	ND	D	ND	ND
10S	ND	ND	ND	D	D	ND
12L	D	ND	ND	D	ND	ND
18S	ND	ND	ND	ND	D	ND
19S	D	ND	ND	D	ND	ND
21S	ND	D	D	D	ND	ND
21L	ND	ND	D	ND	ND	ND
22L	D	D	ND	D	ND	ND
30S	D	D	D	ND	D	ND
30L	D	D	D	D	D	ND
30P	D	D	D	D	D	ND

*Códigos das amostras analisadas: Número sequencial seguido do seguinte código: S=Swab; L = Leite cru; P = Leite Pasteurizado. **Controle Negativo da reação. D: Detectada a amplificação. ND: Não detectada amplificação, ou amplificação após o CT 32.

DISCUSSÃO

Embora exista um volume grande de doadoras cadastradas e ativas no BLH do HMEM não foram todas que dispunham de volume semanal igual ou superior a 400 mL. Esse critério de inclusão foi necessário visto que no BLH-HMEM volumes inferiores a 400 mL não são pasteurizados isoladamente e sim misturados com LHO de outras doadoras. Essa ação é útil para otimizar o processo, porém, caso as amostras de LHOP para o estudo fossem colhidas desse ‘pool’ de amostras não seria possível traçar uma provável rota de contaminação desse LHOP com os resultados de LHOC colhidos em domicílio. Diante disso, o número de amostras foi pequeno (n=30) e se tornou o principal fator limitante, implicando em baixo poder estatístico para obtenção de medidas de associação entre as condições higiênico-sanitárias utilizadas na coleta e os resultados microbiológicos encontrados. Porém, os dados descritivos expostos na tabela 3 permitem indicar que pode haver associação entre alguns hábitos utilizados na coleta do LHO e a presença de micro-organismos no mesmo, apresentados a seguir.

Neste estudo, mesmo 96,7% (n=29) das doadoras afirmando sempre realizarem a higienização das mãos e dos seios antes da coleta, todas as culturas de swab colhidos na região das mãos e dos seios apresentaram crescimento de micro-organismos, com maior prevalência de *S. aureus*, *Enterococcus* spp. e *Klebsiella* spp. A microbiota da pele é composta por bactérias residentes e transitórias. A residente se encontra nas camadas mais profundas e é mais difícil de ser removida; a transitória coloniza a camada mais superior e é de fácil remoção pela lavagem das mãos (OLIVEIRA *et al*, 2011). Cepas de *S. aureus* podem fazer parte da microbiota residente da pele de pessoas saudáveis (MELLO *et al*, 2015), mas bacilos gram-negativos, como *Klebsiella* spp., normalmente fazem parte da microbiota transitória já que em humanos comumente encontra-se *Klebsiella pneumoniae* em nasofaringe e trato gastrointestinal (VUOTTO *et al.*, 2014). Uma intersecção importante para justificar esse achado é a informação de que a maioria das doadoras nunca ou raramente mantém as unhas no tamanho adequado antes da ordenha. Segundo Leão (2018) a região subungueal pode funcionar como reservatório de micro-organismos transitórios e dificultar a eliminação dos mesmos na lavagem das mãos.

Sobre a coleta, a maioria das doadoras utilizam bomba para auxiliar na ordenha. Oliveira e colaboradores (2006) não indicam a utilização desse instrumento por serem de difícil limpeza e esterilização, propiciando a proliferação bacteriana. Embora não tenha sido

realizada coleta de amostra diretamente da bomba tira-leite, o conteúdo microbiológico do LHOC colhido através desse instrumento é um importante sinalizador da dificuldade de higienização do aparelho de forma correta, visto que todas as amostras de LHOC tiveram crescimento de um ou mais micro-organismos, com maior prevalência de *S.aureus* (86,7%), seguido de *Klebsiella spp* (23,3%).

Outro aspecto da coleta que permite associação com os achados microbiológicos é o ato de desprezar o primeiro jato antes de colher o LHO. Quando questionadas sobre a realização dessa ação, somente pouco mais da metade, 53% (n=16), das doadoras disseram sempre realizar esse procedimento e a prevalência de *Klebsiella spp.* foi maior entre as doadoras que não o realizavam. Essa ação contribui para a redução de até 90% da população inicial de bactérias visto que por ação física de arraste, os primeiros mililitros ejetados trazem consigo quase todas as bactérias saprofíticas que colonizam os ductos mamilares devido a permanência de leite na região entre as ordenhas. (BRASIL, 2008).

No presente estudo foram isoladas cepas de *Klebsiella spp.* em 23,3% (n=7) das amostras colhidas das mãos e região mamilo-areolar das doadoras. Dessas, 57,1% (n=4) também apresentaram o mesmo micro-organismo nas amostras de LHOC. Esses dados evidenciam a possibilidade de as condições higiênicas adotadas na coleta interferirem diretamente na qualidade microbiológica do LHO doado.

Nobre e colaboradores (2015) realizaram análise microbiológica de LHOC recebido em um BLH em Tocantis através de coleta domiciliar e encontraram coliformes totais em 29% das amostras estudadas e ressaltam a importância de pesquisa em amostras de leite antes da pasteurização como um indicativo da qualidade da antissepsia realizada durante a coleta, armazenamento e transporte do leite, direcionando a necessidade de orientação das doadoras, e uma avaliação do processo, desde o contato inicial, até a coleta do leite em sua residência.

Através de técnica de PCR, 73,3% (n=11) de todas as cepas de *Klebsiella* isoladas foram classificadas como pertencentes a espécie *Klebsiella pneumoniae* e nenhuma cepa foi classificada como *Klebsiella oxytoca*. A presença majoritária da espécie *Klebsiella pneumoniae* nas amostras colhidas traz preocupação sobre a possibilidade do LHO funcionar como rota para a chegada dessas cepas no ambiente hospitalar e, considerando a imaturidade imunológica e o frequente uso de antibioticoterapia em neonatos, essas cepas serem importantes causadores de infecções (SIMÕES, 2016).

Além da vulnerabilidade dos receptores de LHO que em sua maioria estão internados em UTI neonatal, algumas características dos isolados de *Klebsiella* spp. deste estudo indicam grande capacidade virulenta. Metade das cepas em que foi realizada a detecção de genes de virulência por qPCR apresentaram o gene *rmpA*, que é o responsável por conferir o fenótipo hiper mucoso a *Klebsiella pneumoniae*, devido ao aumento da produção de polissacarídeos capsulares (DERAKHSAN, 2016). O fenótipo hipercapsular aumenta a resistência a uma variedade de defesas humorais, incluindo a morte pelo complemento, ação de beta-defensinas (HBD-1 a 3) e outros peptídeos antimicrobianos (PACZOSA; MECSAS, 2016) e tem sido correlacionada com o aumento da resistência à fagocitose por neutrófilos e macrófagos humanos em comparação com um número de cepas clássicas (POMAKOVA, 2012). E o gene *wcaG*, envolvido na síntese de fucose que está associada ao escape da fagocitose pela bactéria, foi evidenciado em 41,6% (n=5) das cepas analisadas.

Ainda sobre os genes de virulência é importante ressaltar que a amostra de *Klebsiella pneumoniae* isolada do LHOP apresentou os dois genes pesquisados. Esse fato indica que uma cepa com grande potencial patogênico e altamente virulenta estava viável no leite humano ordenhado após a pasteurização, podendo infectar os neonatos que o recebessem. É evidente que o BLH foi sinalizado sobre a presença da cepa e todo o volume de LHOP da doadora foi descartado. Esse fato chama a atenção para a necessidade de controle rigoroso no processo de pasteurização, haja vista que se o mesmo não for executado corretamente micro-organismos podem estar presentes e viáveis no leite distribuído.

Não é possível evidenciar se a cepa de *Klebsiella pneumoniae* presente no LHOP é semelhante a isolada nas outras amostras da mesma doadora, mas existem semelhanças entre as três bactérias: ambas foram classificadas como *Klebsiella pneumoniae* e as três expressaram os dois genes de virulência pesquisados. Surgem então três hipóteses: (1) a cepa resistiu ao tratamento térmico aplicado na pasteurização, (2) a pasteurização não foi realizada da maneira correta para a eliminação do micro-organismo ou (3) a manipulação da amostra de LHO levou a disseminação da cepa de *Klebsiella pneumoniae* no BLH e houve uma recontaminação do LHO após a pasteurização.

A rotina técnica dos BLHs não inclui a identificação dos microrganismos em amostras de LHO, no controle microbiológico é realizado o cultivo do LHOP e, caso exista crescimento é realizado o descarte do volume. Os dados apontados neste estudo indicam a importância de um detalhamento nas análises microbiológicas. Essa maior descrição permite a detecção e compreensão de possíveis fontes de infecção para o ambiente hospitalar. Visto que, mesmo o

micro-organismo sendo eliminado no processo de pasteurização, ele pode ser vinculado a microbiota do ambiente através da manipulação e ser disseminado para as unidades materno-infantis, onde os BLHS são vinculados, contribuindo para o surgimento de infecções em ambiente hospitalar.

Em relação aos ensaios para detecção de genes de resistência associados a produção de ESBLs o estudo deixou evidente que os testes fenotípicos podem subestimar a expressão desses genes pelas cepas. Embora não tenha existido resistência típica de cepas ESBL no antibiograma por disco-difusão, foram identificadas três cepas (20%) com capacidade de indução da produção de ESBL e os genes associados a produção dessa enzima foram isolados em mais de 60% das amostras analisadas. Das cepas submetidas a qPCR 41,6% (n=5) apresentaram os genes SHV, 41,6% (n=5) apresentaram o gene CTXM-1 e 66,6% apresentaram o gene TEM. A maior sensibilidade da técnica de qPCR atrelada a possibilidade de as cepas possuírem o gene e não expressarem justificam esses resultados. Mesmo fenotipicamente essas cepas não apresentando resistência aos beta-lactâmicos a detecção dos genes SHV-1, TEM e CTXM-1 sugere a possibilidade das cepas de *Klebsiella* spp. funcionarem como reservatórios de genes de resistência (DEHSRI et al, 2018).

Não foram realizados estudos recentes de associação de resistência em cepas isoladas de LHO, nem de detecção de genes de resistência nesses isolados. O estudo mais recente foi realizado em 2001, Novak e colaboradores encontraram resistência a antimicrobianos em 45% das cepas de patógenos oportunistas como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. e *Proteus* spp. de isolados obtidos de amostras de LHO de BLH no Rio de Janeiro, o autor aponta essa resistência como provavelmente decorrente da pressão seletiva de antimicrobianos usados sobre a microbiota normal das doadoras ou da veiculação de micro-organismos resistentes do ambiente hospitalar através do contato das doadoras que permanecem no ambiente hospitalar por internação de seus RNs.

CONCLUSÃO

O presente estudo encontrou *Klebsiella* spp. em 36,6% (n=11) das doadoras participantes. Desses isolados, 36,6% (n=4) foram isolados apenas na amostra de mãos e região mamilo-areolar; 36,6% (n=4) apenas em LHOC; 18,18% (n=2) em mãos, região mamilo-areolar e no LHOC e 9,09% (n=1) em todas as amostras colhidas (regiões anatômicas, LHOC e LHOP). Devido ao reduzido tamanho da amostra não foi possível realizar inferências com poder estatístico sobre a associação entre condições higiênico-

sanitárias e os achados microbiológicos. Surge então a necessidade de realização de um estudo epidemiológico, com maior número de participantes, para que seja possível mensurar a força dessa associação.

Também foi evidenciada, através de técnica de qPCR, uma grande quantidade de cepas virulentas: Das cepas submetidas a qPCR 50% apresentaram o gene *rpmA* e 41,6% o gene *wcaG* e com alta prevalência de genes de resistência associados a produção de ESBL: 41,6% para o gene SHV-1; 41,6% para o gene CTXM-1 e 66,6% para o gene TEM. Isso evidencia que o controle microbiológico do LHO precisa ser realizado com rigor para evitar que esses micro-organismos, que são comensais em doadoras de LHO, sejam vinculados a microbiota do BLH.

Recomenda-se então ações de educação e vigilância desde a coleta do LHO em domicílio até a distribuição do LHOP, para inibir a chegada dessas cepas no ambiente hospitalar que podem ser responsáveis por infecções hospitalares em neonatos, aumentando as taxas de morbimortalidade e por consequência os custos em serviços de saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.A.G. Amamentação: um híbrido de natureza e cultura. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**; 1999.
- ALMUNEEF, M., MEMISH, Z., BALKHY, H., ALALEM, H., ABUTALEB, A. Ventilator-Associated Pneumonia in a Pediatric Intensive Care Unit in Saudi Arabia: A 30-Month Prospective Surveillance. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, 25(9), 753-758, 2017.
- ANDRADE, L. N.; MINARINI, L. A. R.; PITONDO-SILVA, A; CLÍMACO, E. C; PALAZZO, I. C. V; MEDEIROS, M. I.; DARINI, A. L. C. Determinants of β -lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. **Can J Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 399-407, 2010
- ANDRADE, E. R. et al. Estudo da prevalência bacteriana e resistência aos antimicrobianos isolados de materiais biológicos em Hospital, no município de Santos -SP- Brasil. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 14, n. 35, p. 5-26, 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 set. 2006.
- BRISSE, S. VAN DUIJKEREN, E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. **Vet Microbiol**, 105: 307 -312, 2005.

COSTA, M; SILVA, W. N. Investigação dos principais micro-organismos responsáveis por infecções nosocomiais em utis neonatais: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**. v. 7 n. 1, 2018.

COSTA, A. L. P; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana a antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**. v.7, p – 45 – 57, 2017.

CUNHA, R.C.M.L.; ARAÚJO, G.C.; BORGES, M.R.M.M.; QUEIROZ, M.V.F.; PIMENTA, R.S. Prevalência de sepse e fatores de risco em neonatos de unidade de terapia intensiva de referência em Palmas, Tocantins, Brasil. **Rev. panam. infectol**, p. 86-94, 2014.

D'ANGELO, R. G; JOHNSON, J. K; BORK, J. T; HEIL, E. L. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 17:7, 953-967, 2016

DEHSHIRI, M.; KHORAMROOZ, S. S; ZOLADL, M.; ABDOLMAJID, Z.; PARHIZGARI, N.; MOTAZEDIAN, M. H.; JAHEDI, S.; SHARIFI, A. The frequency of Klebsiella pneumoniae encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 17:4, 2018.

DERAKHSHAN, S, NAJAR PEERAYEH, S; BAKHSHI, B. Association Between Presence of Virulence Genes and Antibiotic Resistance in Clinical Klebsiella Pneumoniae Isolates. **Laboratory Medicine**, 47(4), 306–311, 2016.

DJORDJEVIC, Z. M; MARKOVIC-DENIC, L, FOLIC, M. M, IGRUTINOVIC, Z, JANKOVIC, S.M. Health care-acquired infections in neonatal intensive care units: Risk factors and etiology. **AJIC: American Journal of Infection Control**, V.43(1), pp.86-88, 2015.

FALAGAS, M. E.; TANSARLI, G. S.; KARAGEORGOPOULOS, D.E.; VARDAKAS, K. Z. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1 -6, 2014.

GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. **Int. J. Antimicrob**, Atenas; 36:50 – 54, 2010.

GOMES, A. É. I; STUCHI, L. P; SIQUEIRA, N. M. G; HENRIQUE, J. B; VICENTINI, R; RIBEIRO, M. L; FERRAZ, L. F. C. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in Klebsiella pneumoniae using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR. **Scientific Reports**, 8(1), 2018

GUH, A. Y; BULENS, S. N.; MU, Y; JACOB, J. T; RENO, J; SCOTT, J; WILSON, L. E.; VAETH, E; LYNFIELD, R; SHAW, K. M; VAGNONE, P. M; BAMBERG, W. M.; JANELLE, S. J.; DUMYATI, G; CONCANNON, C; BELDAVS, Z; CUNNINGHAM, M. C. M; PHIPPS, E. C.; KENSLOW, N; TRAVIS, T; LONSWAY, D; RASHEED, K; LIMBAGO, B M.; KALLEN, A. J. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013. **Journal of American Medical Association**, v. 314, n. 14, p. 1479-1487, 2015.

HINRICHSEN, S. L. Biossegurança e controle de infecções: risco sanitário hospitalar. Rio de Janeiro: **Medsa**. 2^a ed. 2013.

HLOPE, S. T; MCKERROW, N. H. Hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in a paediatric intensive care unit. **South African Journal of Child Health**, 8 (4), pp. 125-128, 2014.

JARLIER, V. Extended broad spectrum B-lactamases conferring transferable resistance to new B-lactam agents in Enterobacteriaceae. Hospital Prevalence and susceptibility patterns. **Infectious Disease**. v. 10, p. 867 - 878, 1998.

LEAO, R. C. Ocorrência de enteroparasitos e coliformes termotolerantes nas mãos de manipuladores de alimentos de um hospital de ensino. **Cad. saúde colet.**, Rio de Janeiro , v. 26, n. 2, p. 211-215, 2018.

LEE, K. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Concise communications**, 2000.

MELLO, M. H. C.; LEAL, A. C. A. M. Controle das infecções na assistência à saúde relacionada à higienização das mãos. **Revista Interd**. v. 8, n. 1, p. 91-97, 2015.

MUSSI-PINHATA, M. M.; DO NASCIMENTO, S. D. Infecções neonatais Hospitalares. **Jornal de Pediatria**, v. 77, Supl. 1, 2001.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 5, p. 411-2, 2012.

PAIXÃO, L.A.; CASTRO, F. F. S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 85-96, jan./jun. 2016.

PAN, Y-J, FANG, H-C, YANG H-C, LIN T-L, HSIEH P-F, TSAI F-C, KEYNAN Y, WANG J-T. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. **J Clin Microbiol** 46:2231–2240, 2008.

PAPP-WALLACE, K.M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M.A.; BONOMO, R.A. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrob Agents Chemother**. 55(11): 4943–4960, 2011.

PEREIRA, P. S. **Estudo da produção de beta-lactamases do tipo ESBL e KPC em cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de hemoculturas em hospitais do Rio de Janeiro**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

PORTA, A;PAROLA L. *Escherichia Coli* Early Onset Sepsis OPEN in Term Newborns: What's New. **SM Journal of Infect Dis**,; 2(1): 1006, 2017.

SEIBERT, G; HÖRNER, R; MENEGHETTI, B. H; RIGHI, R. A; FORNO N. L. F; SALLA, A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein**, São Paulo, v. 12, n. 3, p.282-286, set. 2014.

SILVA K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J Bras Patol Med Lab.** v. 48, n. 2, p. 91-99, abril 2012

SIMÕES, C. M. S. B. **Infeções Hospitalares Bacterianas no Século.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências da Saúde) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

TYSON, J.; EDWARDS, W.; ROSENFELD, A.; BEER, A. Collection methods and contamination of bank milk. **Arch Dis Child.** v.57, p.396-398, 1982.

VUOTTO, C; FRANCESCA, L; BALICE, M. P; DONELLI, G; VARALDO, P. E. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, 3 (3), pp. 743–758, 2014

YEH, K.M; LIN, J.C; YIN, F.Y; FUNG, C.P; HUNG, H.C; SIU, L.K; CHANG, F.Y. Revisiting the importance of virulence determinant *magA* and its surrounding genes in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscesses: exact role in serotype K1 capsule formation. **J Infect Dis** 201; 1259–1267, 2010.

YEH, K-M; KURUP, A; SIU, L.K; KOH, Y.L; FUNG, C-P; LIN, J-C; CHEN, T-L; CHANG, F-Y; KOH, T-H. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. **J Clin Microbiol** 45:466–471, 2007.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M; ANDERSON, G.J; DOMENECH-SANCHEZ, A; BIDDLE, J.W; STEWARD, C.D; ALBERTI, S; BUSH, K; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** ;45(4):1151-61, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Identificou-se uma prevalência de 36,6% de cepas de *Klebsiella* spp. em amostras das doadoras participantes. Desses isolados, 36,6% foram isolados apenas na amostra de mãos e região mamilo-areolar; 36,6% apenas em LHOC; 18,18% , em mãos, região mamilo-areolar e no LHOC e 9,09% em todas as amostras colhidas (regiões anatômicas, LHOC e LHOP). O tamanho reduzido de amostras impossibilitou a realização de inferências com poder estatístico sobre a associação entre as condições higiênico-sanitárias e os achados microbiológicos. Mas, os dados permitem algumas associações que devem ser avaliadas através de um estudo epidemiológico, com maior número de participantes, para que a força dessa associação seja mensurada e ações voltadas para a educação e vigilância sejam adotadas como forma de reduzir a contaminação microbiológica

Das 15 cepas isoladas foi possível, através de técnica de qPCR, investigar genes associados a virulência e a resistência em 12 delas. Dessas doze, 50% apresentaram o gene *rmpA* e 41,6% o gene *wcaG* e alta prevalência de genes de resistência associados a produção de ESBL: 41,6% para o gene SHV-1-1; 41,6% para o gene CTXM-1 e 66,6% para o gene TEM. Esses dados destacam a importância do controle microbiológico do LHO desde a etapa da coleta, visto que, mesmo que eliminados no processo de pasteurização, esses microorganismos podem adentrar o ambiente do BLH, através da veiculação pelo LHO, e ser vinculados a microbiota do ambiente e, conseqüentemente, do hospital materno infantil atrelado.

Ademais, foi isolada uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* em amostra de LHOP, essa cepa apresentou os dois genes de virulência pesquisados e 3 genes de resistência associados a produção de ESBL, o que reforça a necessidade de vigilância do BLH para impedir a veiculação dessa cepa no LHOP distribuído para os RNs. É evidente que durante o estudo foi sinalizada a coordenação do BLH todas as amostras de LHOP com resultados positivos e que o controle microbiológico rotineiro do BLH também identificou o crescimento microbiano na amostra. A identificação da espécie no LHOP é de fundamental importância para chamar a atenção da importância de um controle microbiológico eficaz para que o LHO seja fonte de nutrição para os RNs receptores e não de possível contaminação.

APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras de Leite Humano no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA). Pesquisadores Responsáveis: Marcio Vasconcelos de Oliveira, Luana Andrade Mendes Santana e Nívea Nara Novais Andrade.

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que a senhora não consiga entender, converse com as pesquisadoras responsáveis pela pesquisa para esclarecê-los.

Em caso de prováveis participantes que não saibam ler, o Termo será lido para a mesma por uma das pesquisadoras, esclarecendo todos os passos e conteúdo presente.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre a pesquisa e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Objetivo do Estudo

O objetivo do estudo é: Identificar espécies de bactérias *Enterococcus* spp. e de Enterobactérias (*Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.), por métodos laboratoriais, visando caracterizar a patogenicidade e resistência à antimicrobianos dos microrganismos isolados de amostras da região mamilo-areolar e mãos de doadoras de LHO e de alíquotas de LHO dessas doadoras no momento da ordenha e após a pasteurização, através do serviço do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA).

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de dois anos.

A sua participação no estudo será de um dia para a coleta do material em sua residência e preenchimento de Questionário constituído em três módulos onde são abordadas perguntas fechadas em relação aos Procedimentos Maternos durante a coleta, armazenamento domiciliar de LHO e informações socioeconômicas.

Descrição do Estudo

Participarão do estudo aproximadamente 90 doadoras voluntárias cadastradas no Banco de Leite Humano do Hospital Esaú Matos.

Este estudo será realizado pela Universidade Federal da Bahia, através do Programa de Pós-Graduação em Biociências.

A senhora foi escolhida a participar do estudo porque é doadora voluntária do Banco de Leite Humano e aceitou, mediante contato telefônico, receber as pesquisadoras para esclarecimentos sobre o projeto em seu domicílio.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar a senhora deverá responder a um questionário sobre como realiza a ordenha do leite e algumas informações pessoais para que possamos obter informações importantes para analisar os resultados.

Após o preenchimento do questionário será realizada imediatamente a coleta dos materiais.

Para a coleta de amostra das mãos e região mamilo-areolar (das duas mamas), a pesquisadora estará com equipamentos de proteção individual e utilizará swab estéril. Após a coleta, as amostras serão identificadas e armazenadas imediatamente para evitar contaminações.

Após a coleta do swab será solicitado que a senhora colha uma pequena amostra da ordenha do leite (aproximadamente 2 mL) em um frasco estéril entregue pelas pesquisadoras, após isso a senhora pode seguir rotineiramente a ordenha do leite para entregar ao Banco de Leite.

As amostras serão identificadas com as iniciais da doadora, a data da coleta e o número do questionário respondido.

Também será obtida uma amostra do leite doado após o procedimento de pasteurização no Banco de Leite Humano do Hospital Esaú Matos.

As amostras serão enviadas ao Laboratório de Análises Clínicas do IMS/UFBA para a realização das análises microbiológicas.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

O presente estudo pode ocasionar desconforto, cansaço ou constrangimento no momento de preencher o questionário, para diminuir isso preparamos um questionário com perguntas diretas e respostas apenas de marcar. Além disso pode haver desconforto e constrangimento no momento da coleta das amostras na região dos seios, para diminuir o constrangimento a coleta da amostra das mãos e da região mamilo-areolar será realizada por uma pesquisadora do sexo feminino, treinada para realizar o procedimento de maneira rápida, segura e profissional e a coleta da amostra de leite será realizada pela própria doadora.

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para a participante desse estudo. Todavia, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a identificar microrganismos presentes nas amostras e métodos para diminuir a contaminação do leite. Tais dados serão de suma importância para a avaliação do controle microbiológico do processo de pasteurização das amostras de leite humano do Banco de Leite do Hospital Esaú Matos, bem como a qualidade do leite ofertado no setor da UTI Neonatal e identificação dos possíveis riscos potenciais aos RNs internados na unidade.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração para a realização da ordenha que veio realizar.

Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos pessoais.

Se houver necessidade de solicitar a exclusão de sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com uma das pesquisadoras envolvidas neste estudo por meio dos telefones (77) 99921-5390; (77) 98841-3638.

Após todos os esclarecimentos sobre a pesquisa, caso consinta em participar, assinará duas cópias deste presente termo que também será assinado por uma das pesquisadoras responsáveis, ficando você de posse com uma delas.

Utilização de Registros e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

O questionário que irá conter suas identificações e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Luana Andrade Mendes Santana e Nívea Nara Novais Andrade que poderão ser encontrados na Universidade Federal da Bahia – Campus Anísio Teixeira ou nos respectivos telefones: (77) 99921-5390 e (77) 98841-3638.

Declaração de Consentimento

Concordo e aceito participar do estudo intitulado: “Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras de Leite Humano no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA)”.

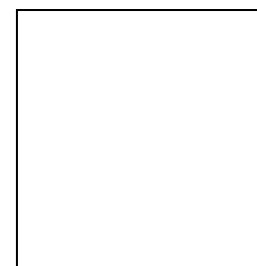
Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização do meu questionário e dos resultados da análise das amostras colhidas para o comitê de Ética e Pesquisa e para agências reguladoras.

Nome do Voluntário

Data

Assinatura do Voluntário



Impressão Digital

Assinatura do Pesquisador Responsável

Data

APÊNDICE 2: QUESTIONÁRIO DOS PROCEDIMENTOS DURANTE A COLETA E ARMAZENAMENTO DOMICILIAR DE LEITE HUMANO ORDENHADO (LHO) E INFORMAÇÕES SOCIO-ECONÔMICAS

(Adaptado de: MENEZES, G. Avaliação dos Procedimentos Higiénico-Sanitários utilizados durante a coleta domiciliar e o transporte do Leite Humano Ordenhado. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, 2011).

DOADORA Nº: _____

DATA: _____

BLOCO 01 – Características Socioeconômicas

1. Idade:

de 18 a 25 anos

de 25 – 30 anos

acima de 30 anos

2. Estado Civil:

Casada

Solteira

Divorciada

Viúva

3. Renda Familiar Total:

Acima de 20 salários mínimos

De 10 a 20 salários mínimos

De 4 a 10 salários mínimos

De 2 a 4 salários mínimos

Menos de dois salários mínimos

4. Número de filhos:

Único filho

Dois filhos

Três filhos

Mais de três filhos

5. Escolaridade:

- () Analfabeto/ até a 3ª Série Fundamental
 () 4ª Série Fundamental
 () Fundamental Completo
 () Médio Completo ou profissionalizante
 () Superior Completo

BLOCO 02 – Práticas higiênicas utilizadas na coleta:

Para responder as perguntas abaixo assinale a coluna com a frequência de realização do procedimento durante as coletas de leite para o Banco de Leite.

Assinale SEMPRE para os procedimentos que realiza em todas as coletas, assinale ÀS VEZES para os procedimentos que realiza em algumas coletas e NUNCA para os procedimentos que não são adotados para a coleta.

PROCEDIMENTO	SEMPRE	ÀS VEZES	NUNCA
Lavar as mãos com água e sabão ou utilização de álcool antes da coleta			
Verificar o tamanho das unhas e cortar, se necessário, antes da coleta.			
Prender os cabelos com auxílio de touca antes da coleta.			
Lavar o seio com água potável antes da coleta.			
Utilizar máscara descartável durante a coleta.			
Evitar conversar durante a coleta.			
Desprezar o primeiro jato de leite no início da coleta.			

BLOCO 03: Materiais e utensílios utilizados para ordenha:

01 - Para a coleta do leite qual frasco você utiliza?

- () Frasco esterilizado fornecido pelo Banco de Leite Humano
 () Outro utensílio de uso domiciliar (Qual: _____)

02 - Se o utensílio for de uso domiciliar, antes da utilização você realiza lavagem e fervura em água por 15 min?

Sim Não

03 – Você utiliza hipoclorito (água sanitária) para desinfetar o utensílio utilizado?

Sim Não

04 – Após a coleta como você armazena o leite imediatamente em geladeira?

Sim Não

APÊNDICE 3: FORMULÁRIO PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS ISOLADAS NO ESTUDO.

 IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS E ENTEROCOCCUS						
Formulário de Identificação						
Tipo de amostra:	<input type="checkbox"/> SWAB <input type="checkbox"/> LHO cru <input type="checkbox"/> LHO Pasteurizado	Número da Amostra: Código sequencial:				
Data de coleta:						
Resultados						
Ágar Sangue:	Crescimento <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Quantos tipos de colônias: _____	Presença de hemólise na colônia: <input type="checkbox"/> Alfa <input type="checkbox"/> Beta <input type="checkbox"/> Não-hemolítica	Observações:	Código da foto:	Responsável pela leitura:
Ágar MacConkey	Crescimento <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Características da colônia: <input type="checkbox"/> Rosa <input type="checkbox"/> Transparente	Observações:		Código da foto:	Responsável pela leitura:
Coloração de Gram	Resultado:		Observações:		Código da foto:	Responsável pela leitura:
Chromoagar	Resultado: (Característica colonial)		Resultado do fabricante:		Código da foto:	Responsável pela leitura:
Para Enterobactérias						
CONFIRMAÇÃO	Resultados:					
	<input type="checkbox"/> Totalmente	<input type="checkbox"/> Apice amarelo +	<input type="checkbox"/> Apice	<input type="checkbox"/> Totalmente	<input type="checkbox"/> Produtor de Gás	
TSI	vermelho	base vermelha	vermelho + base amarela	amarelo	<input type="checkbox"/> Produtor de H ₂ S	

Para Enterobactérias			
PROVAS BIOQUÍMICAS	Resultados:		
ARGININA	Crescimento () Positivo () Negativo	Código da foto:	Responsável pela leitura:
ORNITINA	Crescimento () Positivo () Negativo	Código da foto:	Responsável pela leitura:
LISINA	Crescimento () Positivo () Negativo	Código da foto:	Responsável pela leitura:
SIM	PRODUÇÃO DE H₂S () Positivo () Negativo INDOL () Positivo () Negativo MOTILIDADE () Positivo () Negativo	Código da foto:	Responsável pela leitura:
CITRATO	Crescimento () Positivo () Negativo	Código da foto:	Responsável pela leitura:
UREASE	Crescimento () Positivo () Negativo	Código da foto:	Responsável pela leitura:

Bactéria encontrada: _____

ANEXO 1 - : BULA BD CHROMagar ORIENTATION MEDIUM



INSTRUÇÕES DE
UTILIZAÇÃO – MEIOS EM
PLACAS PRONTOS A
USAR



PA-257481.03

Rev.: Sep 2011

BD CHROMagar Orientation Medium

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BD CHROMagar Orientation Medium** (Meio de orientação CHROMagar) é um meio não selectivo para o isolamento, identificação directa, diferenciação e enumeração de agentes patogénicos do aparelho urinário. O **BD CHROMagar Orientation Medium** permite a diferenciação e identificação de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sem necessidade de realizar testes de confirmação.

PRINCÍPIOS E EXPLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Método microbiológico.

A *Escherichia coli*, os enterococos e os grupos *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* e *Proteus-Morganella-Providencia* são os organismos mais frequentemente responsáveis pelas infecções do aparelho urinário (=IAU). Entre sessenta e 70% das IAU são provocadas pela *E. coli* em cultura pura ou juntamente com enterococos. O *Staphylococcus saprophyticus* e o *Streptococcus agalactiae* são, embora menos frequentemente, encontrados nas IAU das mulheres.

Devido às diferentes susceptibilidades antimicrobianas dos agentes envolvidos, é necessário realizar grande número de testes bioquímicos para identificar as respectivas espécies de modo a poder aplicar uma terapêutica antimicrobiana eficaz. Esta é uma das tarefas mais morosas num laboratório que processa amostras de urina. As espécies ou grupos de organismos mais frequentemente isolados produzem enzimas característicos. Deste modo, é possível identificar estes organismos relativamente ao nível de espécies com um número limitado de testes de utilização e fermentação de substratos.^{1,2}

Alguns dos organismos envolvidos produzem enzimas, quer para o metabolismo da lactose, quer dos glucosídeos, quer de ambos, ao passo que outros não produzem nenhuma destas enzimas. Como exemplo, a *E. coli* produz enzimas provenientes do metabolismo da lactose, mas é negativa para a β -glucosidase. Outros membros da família *Enterobacteriaceae* são positivos para a β -glucosidase, mas não contêm as enzimas necessárias para a fermentação da lactose, podendo outros conter os dois tipos de enzimas ou mesmo nenhuma delas. As beta-glucosidases também se encontram nos cocos Gram positivos, como por exemplo os *Enterococcus* spp. e os *Streptococcus agalactiae*. A triptofano deaminase (TDA) é uma enzima que se encontra caracteristicamente no grupo de organismos *Proteus-Morganella-Providencia*.

As avaliações do desempenho demonstraram que o **BD CHROMagar Orientation Medium** é superior aos meios de diferenciação vulgarmente utilizados para o isolamento, diferenciação e contagem dos agentes patogénicos das IAU como, por exemplo, o ágar de CLED ou uma combinação de Ágares de Sangue e de MacConkey.³⁻⁵ O **BD CHROMagar Orientation Medium** permite a identificação de *E. coli* e de enterococos directamente na placa de isolamento; além disso, é possível realizar uma presumível identificação da maioria das estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* e *S. agalactiae*, bem como dos grupos *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (=KES) e *Proteus-Morganella-Providencia* (=PMP) através da coloração da colónia e do meio. Uma vez que o **BD CHROMagar Orientation Medium** não é selectivo, desenvolver-se-ão outros agentes patogénicos das IAU, sendo, no entanto, necessários testes bioquímicos para a sua identificação.

O **CHROMagar Orientation Medium** foi desenvolvido por A. Rambach e é comercializado pela BD no âmbito de um acordo de licença com a CHROMagar, Paris, França.

No **BD CHROMagar Candida Medium**, as peptonas especialmente seleccionadas para o efeito fornecem os nutrientes. A mistura de cromogénios é composta por substratos artificiais (cromogénios), que libertam compostos de várias cores na sequência da degradação por enzimas microbianas específicas, assegurando assim a diferenciação directa de determinadas espécies, ou a detecção de determinados grupos de organismos, utilizando apenas um número mínimo de testes de confirmação.

REAGENTES

BD CHROMagar Orientation Medium

Fórmula* por Litro de Água Purificada

Cromopeptona	16,1 g
Mistura de cromogénios	1,3
Ágar	15,0

pH 6,9 ± 0,2

*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

PRECAUÇÕES

IVD . Apenas para uso profissional. ⓧ

Não utilizar as placas que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secura, fissuras ou outros sinais de deterioração.

Consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO** para informação sobre os procedimentos de manuseamento asséptico, os riscos biológicos e os procedimentos de eliminação do produto usado.

ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

Após recepção das placas, conservar no escuro a uma temperatura entre 2 e 8°C, dentro do invólucro original até ao momento da utilização. Evitar congelar e aquecer excessivamente. As placas podem ser inoculadas até ao prazo de validade (ver a etiqueta da embalagem) e incubadas durante o tempo de incubação recomendado.

As placas são fornecidas em pilhas de 10 placas e, quando uma destas pilhas é aberta, as respectivas placas terão de ser utilizadas no prazo máximo de uma semana, se forem conservadas em local limpo a uma temperatura entre 2 e 8°C.

ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

Após recepção das placas, conservar no escuro a uma temperatura entre 2 e 8°C, dentro do invólucro original até ao momento da utilização. Evitar congelar e aquecer excessivamente. As placas podem ser inoculadas até ao prazo de validade (ver a etiqueta da embalagem) e incubadas durante o tempo de incubação recomendado.

As placas são fornecidas em pilhas de 10 placas e, quando uma destas pilhas é aberta, as respectivas placas terão de ser utilizadas no prazo máximo de uma semana, se forem conservadas em local limpo a uma temperatura entre 2 e 8°C.

CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR

Inocular amostras representativas com as seguintes estirpes (para mais detalhes, consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO**). Incubar as placas em posição invertida e em condições aeróbias, a uma temperatura entre 35 e 37 °C, durante 20 a 24 h.

Estirpes	Resultados de crescimento
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crescimento bom a excelente; colónias transparentes, rosa escuro a vermelho claro, de tamanho médio a grande
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Crescimento bom a excelente; colónias de tamanho médio, azul forte, com ou sem halos violetas
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	Crescimento bom a excelente, colónias de tamanho médio, tonalidade pálida a bege, envoltas num halo de cor âmbar a castanho; nas áreas de crescimento denso, o meio pode apresentar-se completamente âmbar a castanho. Inibição parcial a completa da proliferação.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Crescimento bom a excelente; colónias pequenas, azul-esverdeado a azul
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Crescimento razoável a bom; colónias de tamanho diminuto a pequeno, azul-esverdeado claro a azul claro, com ou sem halos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crescimento bom a excelente; colónias de dimensão média a pequena, com a sua cor natural (branco a creme)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305 (=NCTC 10516)	Crescimento razoável a bom; colónias pequenas, opacas, vermelho claro a cor-de-rosa
Não inoculadas	Incolor a âmbar muito claro, transparente

PROCEDIMENTO

Materiais fornecidos

BD CHROMagar Orientation Medium (placas **Stacker** de 90 mm). Microbiologicamente controlado.

Materiais não fornecidos

Meios de cultura auxiliares, reagentes e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Tipos de amostra

Este meio destina-se exclusivamente à enumeração e diferenciação de bactérias na urina. É possível utilizar urina de jacto médio ou urina de cateterização ou urina colhida através de uma punção supra-púbica na bexiga (consultar também **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**). Cumprir as técnicas assépticas para a colheita de amostras de urina. A urina deve ser directamente espalhada no meio (num período de tempo não superior a 2 h após a colheita) ou deve ser mantida no frigorífico (por um período inferior a 24 h) para evitar o crescimento excessivo de agentes infecciosos ou contaminantes antes da inoculação deste meio.

Procedimento do teste

A utilização de ansas calibradas ou de outras técnicas vulgarmente utilizadas para a colocação de amostras de urina em placas é obrigatória para a obtenção de colónias isoladas com as suas cores e formas típicas.

Colher uma amostra de urina não diluída e bem misturada utilizando uma ansa calibrada (0,01 ou 0,001 mL). Certificar-se de que é feita a aplicação adequada da amostra na ansa. Proceder à inoculação da amostra no meio da placa numa única faixa a partir da qual ocorre a propagação adicional do inóculo.^{6,7} Incubar as placas inoculadas em posição invertida e em condições aeróbias, a uma temperatura entre 35 e 37°C, durante 20 a 24 h. **Evitar a exposição à luz durante a incubação, uma vez que isso poderá destruir os cromogénios.** Assim que as cores das colónias se tiverem desenvolvido, poder-se-ão expor à luz.

Resultados

Após a incubação, as placas devem mostrar colónias isoladas nas áreas onde o inóculo foi diluído correctamente. O Quadro 1 e o Esquema 1 devem ser utilizados para identificação ou diferenciação e como linha de orientação para outros testes de confirmação. Pode utilizar-se uma coloração Gram e a microscopia para confirmar os resultados.

Testes de confirmação

Realizar testes de confirmação conforme necessário (Quadro 1, Esquema 1). Não aplicar qualquer agente de detecção directamente sobre as colónias com **BD CHROMagar Orientation Medium**. Em vez disso, os testes devem ser realizados sobre papel de filtro com crescimento proveniente das respectivas colónias.

No que se refere às colónias de *E. coli* que são cor-de-rosa escuro a vermelho claro, mas cuja dimensão é diminuta a pequena, não utilizar o reagente indol de Kovac, uma vez que a respectiva cor da colónia pode interferir com a cor vermelha de um teste com indol positivo; em vez disso, utilizar reagente indol com dimetilaminocinamaldeído (DMACA) (verde = positivo). Se forem utilizados outros testes de confirmação ou sistemas de identificação bioquímica, é necessário seguir as instruções que acompanham estes testes ou sistemas.

Realizar testes de confirmação para *Enterococcus* apenas se for necessária uma especificação que vá além da simples identificação do género.

Quadro 1: Linhas de orientação para identificação com base nas diferentes cores da colónia

Organismo	Aspecto com o BD CHROMagar Orientation Medium	Testes de confirmação (Necessários para maior diferenciação)
<i>E. coli</i> ^a	Colónias transparentes cor-de-rosa escuro a vermelho claro de média a grande dimensão, com ou sem halos no meio circundante	
Grupo KES ^b	Colónias de tamanho médio, azul a azul-escuro, com ou sem halos violetas	BBL CRYSTAL E/NF para diferenciação dentro do género
Grupo PMP ^c	Colónias pálidas a beges circundadas por halos castanhos ^d	Indol, H ₂ S ^e , ODC ^f , BBL CRYSTAL E/NF para diferenciação dentro do mesmo género
Enterococos	Colónias azul-verdes, de pequena dimensão	
<i>S. agalactiae</i>	Colónias de tamanho diminuto a pequeno, azul-esverdeado claro a azul, com ou sem halos	PIR ^g
<i>S. saprophyticus</i> (maioria das estirpes)	Colónias pequenas, opacas, vermelho claro a cor-de-rosa, com ou sem halos	Disco de novobiocina de 5 µg ^h
Outros (incluindo leveduras)	Pigmentação natural (creme)	Testes de identificação bioquímicos ou serológicos apropriados

Para notas de rodapé a-h, ver o Esquema 1

Esquema 1: Linhas de orientação para a realização de testes de identificação em organismos selecionados

Aspecto da colónia				
De pequena dimensão, cor-de-rosa, opaca	⇒ Disco de novobiocina de 5 µg	⇒ sensível	⇒ <i>S. intermedius</i> , <i>S. simulans</i>	BBL CRYSTAL GP para diferenciação dentro do mesmo género
		⇒ resistente	⇒ <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>	
Colónias incolores a beges, meio cor-de-laranja a castanho	⇒ Grupo PMP	⇒ Teste com indol de DMACA ⁱ	⇒ verde (positivo)	
				↓
			H ₂ S positivo ^e	⇒ <i>P. vulgaris</i>
			H ₂ S negativo ^e	⇒ <i>Providencia</i> spp., <i>Morganella</i> spp.
			⇒ incolor a cor-de-rosa (negativo)	
	ODC positivo ^f	⇒ <i>P. mirabilis</i>		
	ODC negativo ^f	⇒ <i>P. penneri</i>		

^a Ver **Limitações do Procedimento**

^b KES = grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*

^c PMP = grupo *Proteus-Morganella-Providencia*

^d A cor âmbar a castanha deve-se à triptofano deaminase (TDA) positiva, comum a todos os organismos do grupo PMP. Cerca de 50% das estirpes de *P. vulgaris* produzem colónias azuis num meio âmbar a castanho.

^e Teste de sulfureto de hidrogénio convencional.

^f Teste de ornitina decarboxilase convencional.

^g Teste de piroglutamato para pirrolidonil arilamidase.

^h Inocular espalhando o isolado numa placa de ágar de Mueller Hinton II. Colocar um disco de novobiocina (5 µg) sobre a placa inoculada. Incubar durante 18 a 24 h a uma temperatura entre 35 e 37°C e determinar o tamanho da zona de inibição. (resistente: ≤ 16 mm, sensível: > 16 mm).

ⁱ DMACA= Reagente Dimetilaminocinamaldeído para produção de indol. Aplicar o reagente sobre papel de filtro e esfregar uma das colónias na área que contém o reagente no papel de filtro. Esperar 10 – 20 segundos. Uma cor **verde** é indicativa de produção de indol (vermelho ou incolor = negativo).

Cálculo e interpretação dos resultados^{6,7}

Contar o número de colónias (cfu) na placa. Caso tenha sido utilizada uma ansa de 0,01 mL, cada colónia resultante representa 100 CFU/mL; caso tenha sido utilizada uma ansa de 0,001 mL, cada colónia corresponde a 1000 CFU/mL de urina.⁷

Urina de jacto médio e cateterização: As linhas de orientação actuais indicam que para um único isolado uma densidade de $\geq 10^5$ cfu/mL indica infecção, $< 10^5$ cfu/mL indica contaminação uretral ou vaginal e entre 10^4 a 10^5 CFU/mL necessita de ser novamente avaliada com base na informação clínica.⁷

As bactérias contaminantes aparecem normalmente em número reduzido com variações na morfologia das colónias.

Urina colhida através punção supra-púbica na bexiga: Uma vez que a bexiga é estéril em indivíduos não infectados, quaisquer cfu detectadas indicam uma infecção.

Utilizando este meio, os agentes patogénicos do aparelho urinário apresentarão geralmente contagens elevadas, com cor e morfologia uniforme das colónias.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O **BD CHROMagar Orientation Medium** é um meio cromogénico para identificação directa, diferenciação e enumeração de agentes patogénicos comuns do aparelho urinário. O meio é apropriado para o isolamento de muitos microorganismos de crescimento aeróbio, como as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e outros bastonetes gram-negativos não fermentadores, os enterococos, os estafilococos e muitos outros provenientes de amostras de urina. As avaliações do desempenho demonstraram que o **BD CHROMagar Orientation Medium** possui vantagens relativamente aos outros meios de diferenciação utilizados no isolamento, diferenciação e enumeração de elementos patogénicos das IAU como, por exemplo, o Ágar de CLED ou uma combinação de ágar de Sangue e de MacConkey.³⁻⁵

O **BD CHROMagar Orientation Medium** permite a diferenciação e a identificação de *E. coli* e enterococos sem testes de confirmação, com base nos critérios para identificação estabelecidos pela norma M35-A da CLSI, "Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast; Approved Guideline."⁸ A presumível identificação de *S. saprophyticus*, *S. agalactiae* e dos grupos *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES) e *Proteus-Morganella-Providencia* (PMP) é possível através da morfologia e pigmentação da colónia e descoloração do meio.

Limitações do procedimento

Uma vez que este meio não é selectivo, outros agentes patogénicos das IAU irão desenvolver-se. As colónias que apresentam a sua cor natural e que não reagem com os substratos cromogénicos no **BD CHROMagar Orientation Medium** têm de ser submetidas a outros processos de diferenciação com os testes bioquímicos ou serológicos apropriados. Consultar a bibliografia.^{1,2}

As colónias de *E. coli* que se apresentam cor-de-rosa escuro a vermelho claro, mas que têm dimensão diminuta a pequena, têm de ser submetidas a outros testes de confirmação como, por exemplo, indol com mancha (reagente indol com DMACA).

Outros bastonetes Gram negativos que não os pertencentes ao grupo KES podem produzir colónias grandes azuis em **BD CHROMagar Orientation Medium**, sendo por isso necessário realizar outros testes bioquímicos para a respectiva identificação.¹¹

Em casos muito raros, poderão encontrar-se presentes *Listeria monocytogenes* ou outras espécies de *Listeria* na urina (por exemplo, após um aborto provocado por estes agentes). A *Listeria* produzirá colónias de cor azul a azul-verde que são negativas quando submetidas ao teste PIR, à semelhança do que acontece com *Streptococcus agalactiae*. Poderá, por isso, ser útil preparar uma coloração Gram de todas as estirpes que produzam neste meio colónias de dimensão muito pequena a pequena, de cor azul a azul-verde e que têm resultados negativos quando submetidas ao teste PIR. A presença de bastonetes Gram positivos poderá ser um indicativo da presença de espécies de *Listeria*, mas é necessário recorrer a outros testes bioquímicos para confirmar a sua identificação.

Em casos muito raros, os isolados de *Aeromonas hydrophila* podem produzir colónias cor-de-rosa a vermelho claro. Poderão diferenciar-se da *E. coli* através de um teste de oxidase (*Aeromonas* = positivo; *E. coli* = negativo).

ANEXO 2: BULA CEPA ATCC 70063 *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*



Product Sheet

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* (ATCC® 700603™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 700603™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Designation: K6 [CCUG 45421, LMG 20218, MCV37]
Deposited Name: *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan
Product Description: Control for extended-spectrum beta-lactamase production. Produces beta-lactamase SHV-18. This organism is a CLSI quality control strain for antimicrobial susceptibility testing

Propagation

Medium

ATCC® Medium 3: Nutrient agar or nutrient broth

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #3 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #3 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours.

Notes

Purified genomic DNA of this strain is available as ATCC® 700603D-5.
Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.

**ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ENSINO EM PESQUISA – HOSPITAL
ESAÚ MATOS - VITÓRIA DA CONQUISTA**

Vitória da Conquista, 17 de Agosto de 2017.

Ofício - Def. 070/ 2017 – CEPE

Da: Comissão de Ensino, Pesquisa e Extensão – FSVC.
Att: Sr. Prof. Márcio Vasconcelos de Oliveira

Cumprimentando-o cordialmente, e em resposta à solicitação para realização de coleta de dados na Fundação Pública de Saúde de Vitória da Conquista, por meio do orientador do mestrado de Biociências do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia – UFBA, Sr. Prof. Márcio Vasconcelos de Oliveira, com a finalidade de integração de dados para a pesquisa intitulada “IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E PATOGENICIDADE DE ENTEROCOCCUS SSP. E ENTEROBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE DOADORAS DO BANCO DE LEITE HUMANO DO HOSPITAL MUNICIPAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA (BA).” Tal solicitação encontra-se **DEFERIDA** pela Comissão de Ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação Pública de Saúde de Vitória da Conquista.

Atenciosamente,


Sr. Stênio Fernando Pimentel Duarte,
Presidente do CEPE

ANEXO 4 – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DE PROJETO – IMS/UFBA




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto Multidisciplinar em Saúde
Campus Anísio Teixeira



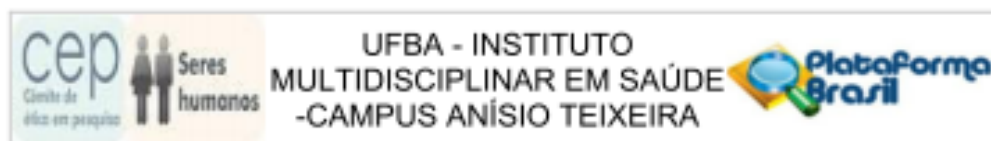
Vitória da Conquista, 11 de junho de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins, que na 116ª sessão ordinária da Congregação do IMS, ocorrida no dia 06/06/2018, foi aprovado o projeto de pesquisa intitulado: **"IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E PATOGENICIDADE DE ENTEROCOCCUS SSP. E ENTEROBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE DOADORAS DO BANCO DE LEITE HUMANO DO HOSPITAL MUNICIPAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA (BA)"**, coordenado pelo professor **MÁRCIO VASCONCELOS OLIVEIRA** e que conta com a participação, na equipe executora, de **CLAUDIO LIMA SOUZA, NÍVEA NARA NOVAIS ANDRADE e LUANA ANDRADE MENDES SANTANA**, com vigência entre 05/03/2018 a 05/03/2019.


Orlando Silvio Calres Neves
Presidente da Congregação
UFBA – IMS - CAT

ANEXO 5: PARECER CONSUBSTANCIADO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – IMS/UFBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA).

Pesquisador: Márcio Vasconcelos Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80800717.8.0000.5556

Instituição Proponente: Instituto Multidisciplinar em Saúde-Campus Anísio Teixeira

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.475.023

Apresentação do Projeto:

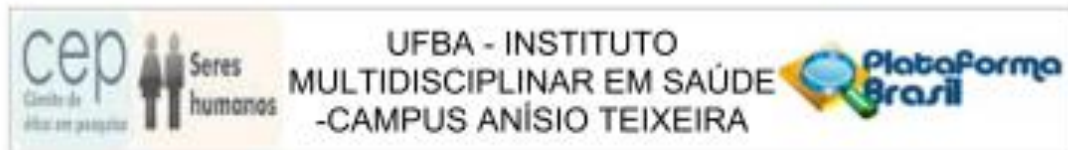
O projeto intitulado "Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA)" possui um pesquisador principal e duas assistentes. Trata-se de um estudo de corte transversal com doadoras regulares de leite humano cadastradas nesse Banco de Leite Humano.

As altas taxas de infecções hospitalares entre recém-nascidos são uma grande preocupação na área de saúde, pois fatores críticos mostraram estar associados com este problema, incluindo os alimentos, como o leite humano.

Estudos comprovam que o leite humano é uma fonte de micro-organismos para a colonização inicial da microbiota do recém-nascido que são frequentemente encontradas do mamilo, auréola e tecidos adjacentes, bem como dutos lactíferos. Embora a pasteurização do leite humano ordenhado (LHO) seja um processo adequado para desinfecção, cepas bacterianas podem se apresentar viáveis no LHO a ser consumido por RNs, que em sua maioria estão na UTI, são prematuros e altamente vulneráveis, o que pode levar às infecções bacterianas brandas à graves.

Deste modo, micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* e espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. podem colonizar principalmente o trato gastrointestinal de doadoras de LHO saudáveis e contaminar o

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58
Bairro: CANDEIAS **CEP:** 45.029-094
UF: BA **Município:** VITÓRIA DA CONQUISTA
Telefone: (77)3429-2720 **E-mail:** cepims@ufba.br



Continuação do Projeto: 2.475.023

LHO.

Quanto à metodologia, os pesquisadores informam que os isolados serão obtidos através de coleta de amostra estimada de 90 doadoras em região mamilo-areolar, mãos e leite materno; desta última, em alíquota antes e após a pasteurização pelo Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA). O estudo ocorrerá sequencialmente durante o período de três meses, ainda a determinar, entre os anos de 2017 e 2018. As doadoras cadastradas no BLH, que estiverem doando regularmente mais que 400 mL de leite humano (LH) por semana, serão convidadas por contato telefônico a participar do projeto.

Será aplicado um Questionário versando sobre informações socio-econômicas e Hábitos Higiênico-Sanitários da Coleta de Leite Humano.

Será utilizado um único swab para coleta de ambas as regiões que serão identificados com códigos de números sequenciais crescentes e iniciais da doadora para rastreabilidade dos resultados. Em seguida, será solicitado à doadora que um pequeno volume inicial de LHO (aproximadamente 1mL) seja colhido em frasco estéril fornecido pela pesquisadora a fim de realizar cultivo do LHO, informando que o volume sequencial deverá ser colhido normalmente como de costume em frasco cedido pelo BLH, bem como as etapas subsequentes até envio para pasteurização. Este frasco receberá um selo de marcação fornecido pela pesquisadora para que bebês, proporcionando vantagens nutricionais, imunológicas e psicológicas, além de vantagens econômicas reconhecidas e inquestionáveis.

Coleta de amostras: A ordenha do LH será realizada pela própria doadora, mediante procedimentos higiênico-sanitários habitualmente utilizados pela mesma. Os swabs serão inoculados em meio de transporte Stuart dentro de caixa térmica lacrada, sem refrigeração e a alíquota de leite cru será transportada em caixa térmica lacrada, refrigerada (com utilização de gelo). As caixas de transporte serão imediatamente encaminhadas ao Laboratório 04 do Instituto Multidisciplinar em Pesquisa – UFBA para semeadura.

Processamento de amostras: Serão inicialmente inoculadas em meio de enriquecimento BHI e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após isso, serão repicadas em placas de Petri com meio Ágar Sangue, Ágar MackConkey e Chromoágar Orientation Medium.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Isolar e identificar bactérias do gênero *Enterococcus* ssp. e espécies de Enterobactérias em amostras da região mamilo-areolar, mãos e alíquotas de leite provenientes de doadoras do Banco

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58
 Bairro: CANDEIAS CEP: 45.029-094
 UF: BA Município: VITÓRIA DA CONQUISTA
 Telefone: (77)3429-2720 E-mail: cepims@ufba.br

Continuação do Parecer: 2.475.023

de Leite Humano do Hospital Esau Matos – Vitória da Conquista, Bahia, visando caracterizar sua patogenicidade e resistência à antimicrobianos.

Objetivo Secundário:

Isolar e identificar cepas de *Enterococcus* spp., e de espécies de *Enterobacteriaceae* em amostras colhidas de região mamilo-areolar, mãos e alíquotas de leite de doadoras selecionadas para o estudo. Avaliar os procedimentos higiênico-sanitários adotados pelas doadoras para coleta e conservação do leite ordenhado por meio de informações obtidas com aplicação de um questionário.

Caracterizar fenotipicamente micro-organismos de interesse isolados das amostras das doadoras selecionadas para o estudo. Determinar o perfil de resistência antimicrobiana bem como a presença de genes relacionados à resistência e virulência nos isolados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

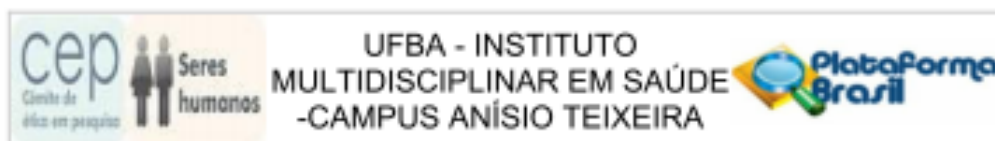
Quanto aos riscos, o pesquisador informa que os questionários não oferecem risco a integridade das doadoras, mas podem provocar desconforto e/ou cansaço pela necessidade de responderem os pesquisadores no momento prévio à ordenha do Leite Humano em seu domicílio; Ressalta que algumas das participantes podem não estar ainda habituadas com a rotina de amamentação exclusiva que por muitas vezes costuma deixar as nutrizes cansadas por alterar hábitos de sono e que pode ocorrer algum tipo de constrangimento em face do teor dos questionamentos que serão feitos.

Afim de reduzir estes potenciais riscos previstos, propõe contato inicial com as doadoras para seleção de melhor horário para recebimento dos pesquisadores; informa que para maior agilidade, o questionário foi elaborado apenas com perguntas objetivas.

Informa que o anonimato das doadoras e das informações obtidas em domicílio será garantido mediante a aplicação do TCLE e para minimizar o desconforto para as doadoras no momento da coleta de amostras nos seios, as pesquisadoras responsáveis pela coleta serão mulheres.

Informa que os Benefícios do estudo serão importantes para a avaliação do controle microbiológico do processo de pasteurização das amostras de leite humano do Banco de Leite do Hospital Municipal Esau Matos, em Vitória da Conquista. Além de que este estudo pode mostrar o perfil microbiano que integra o leite doado, sendo possível a identificação de possíveis riscos aos RNs e a outros pacientes internados na unidade hospitalar, em caso de descuido com o processamento do leite doado.

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58	
Bairro: CANDEIAS	CEP: 45.029-094
UF: BA	Município: VITORIA DA CONQUISTA
Telefone: (77)3429-2720	E-mail: capima@ufba.br



Continuação do Parecer: 2.475.023

Outros	Questionario.pdf	20:50:42	Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Escarecido_.pdf	01/09/2017 20:48:41	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo.pdf	01/09/2017 20:44:37	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	01/09/2017 19:45:43	Márcio Vasconcelos Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITÓRIA DA CONQUISTA, 26 de Janeiro de 2018

Assinado por:
Raquel Souza
(Coordenador)

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58
Bairro: CANDEIAS **CEP:** 45.029-094
UF: BA **Município:** VITÓRIA DA CONQUISTA
Telefone: (77)3429-2720 **E-mail:** cepima@ufba.br

