

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

THAIS MARCELLE BOSISIO TREVIZOLI

A importância da colonização no processo de infecção por bactérias Gram-negativas multirresistentes em pacientes hospitalizados

Maringá
2013

THAIS MARCELLE BOSISIO TREVIZOLI

A importância da colonização no processo de infecção por bactérias Gram-negativas multirresistentes em pacientes hospitalizados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Bronharo Tognim

Maringá
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

THAIS MARCELLE BOSISIO TREVIZOLI

A importância da colonização no processo de infecção por bactérias Gram-negativas multirresistentes em pacientes hospitalizados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Maria Cristina Bronharo Tognim
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Celso Luíz Cardoso
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Lourdes Botelho Garcia
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 18 de dezembro de 2013.

Local de defesa: Sala 112-B, Bloco T-20, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me direcionado, capacitado, me dado sabedoria e força para que este trabalho fosse realizado. Sou imensamente grata pela Sua misericórdia e graça em minha vida.

Ao meu marido, Samuel, que tem lutado comigo, me incentivado, ajudado, alegrado e aconselhado em todo o tempo. Esta conquista é nossa.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por todo o esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui, um trabalho árduo do qual eu sou fruto.

Às minhas irmãs Lílian e Carol, que são minhas melhores amigas, por estarem sempre comigo mesmo de longe.

À minha orientadora Prof. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim que proporcionou que meu aprendizado fosse além de assuntos científicos, uma pessoa maravilhosa que se tornou referência pra mim.

À professora Lourdes Botelho Garcia e aos professores Celso Luiz Cardoso e Benício Alves de Abreu Filho pelo ensino, disposição e apoio científico.

Às funcionárias do laboratório de Microbiologia Básica, Maria, Lurdes, Vilma, Rosana e Adriana pelo auxílio que me deram em várias ocasiões sempre com muita dedicação e por tornar o laboratório um ambiente tão agradável.

Aos meus amigos de pesquisa, Mirian, Nattaly, Giselle, Maisa, Bruno, Jânio, Aline, Kelly e especialmente a Thatiany, que eu considero como minha irmã mais velha do laboratório. Obrigada pelo companheirismo, amizade e colaboração.

Aos amigos da Igreja que se tornaram minha nova família em Maringá, especialmente Daisy, Greizer e Daiane, por estarem comigo nessa caminhada.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

A importância da colonização no processo de infecção por bactérias Gram-negativas multirresistentes em pacientes hospitalizados

RESUMO

A colonização tem sido considerada um fator importante para o processo de infecção. Estudos envolvendo a colonização na infecção por bactérias Gram-positivas multirresistentes têm sido publicados, entretanto, em relação aos bacilos Gram-negativos este assunto tem sido pouco investigado. O objetivo do presente estudo foi avaliar a importância da colonização na infecção por bactérias Gram-negativas multirresistentes em pacientes hospitalizados. Para a investigação foram selecionados pacientes que apresentassem positividade em culturas de vigilância (amostras de colonização) e também em culturas de processos infecciosos por bactérias Gram-negativas de mesma espécie, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2012 do hospital Santa Casa e no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012 do Hospital Universitário de Maringá. A detecção dos genes de beta-lactamases foi realizada pela metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) do tipo multiplex. A caracterização genotípica dos isolados foi feita por duas metodologias: *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC-PCR e *Repetitive Extragenic Palindromic* REP-PCR. Foram incluídos no estudo 69 pacientes e 197 amostras. As principais bactérias Gram-negativas envolvidas nos processos de colonização e infecção foram *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. A colonização prévia por bactérias Gram-negativas foram geneticamente relacionadas à infecção em 70,6% e as amostras de colonização após o processo infeccioso com identidade genética puderam ser recuperadas em 75,9% dos casos. Para *P. aeruginosa* a relação clonal foi verificada em sua maioria apenas entre os isolados de colonização e infecção de um mesmo paciente, para *A. baumannii* foi verificada disseminação clonal entre pacientes distintos nos dois hospitais avaliados. Foi verificada a presença de genes e perfis de resistência nas amostras colonizantes idênticos aos das amostras infectantes em longos períodos de colonização. Os dados obtidos no estudo demonstram uma grande associação entre a colonização e a infecção de pacientes por bactérias Gram-negativas multirresistentes e indicam que culturas de vigilância ou ainda a descolonização particularmente no caso de *A. baumannii* possam ser muito úteis ao controle de infecções por estes microrganismos.

Palavras – chave: Bactérias multirresistentes. Colonização. Infecção. Bacilos Gram-negativos. Caracterização genotípica.

The role of colonization process in infection by multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients

ABSTRACT

Colonization has been considered an important factor for the infection process. Several reports involving colonization in infection multiresistant Gram-positive bacteria has been published, however to Gram-negative bacteria this subject has been little investigated. The aim of this study was to evaluate the importance of colonization in infection multiresistant by Gram-negative bacteria in hospitalized patients. For research were selected patients who had positive surveillance cultures (samples for colonization) and also cultures of infectious processes by Gram-negative bacteria of the same species, from January 2009 to December 2012 the Santa Casa hospital and January 2011 to December 2012 at the University Hospital of Maringá. The detection of beta-lactamase gene was carried out by the methodology of polymerase chain reaction (PCR) multiplex. Genotypic characterization of the isolates was performed by two methods: *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC - PCR and *Repetitive Palindromic Extragenic* REP- PCR. Sixty-nine patients and 197 samples were included in the study. The main Gram-negative bacteria involved in the processes of colonization and infection were *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. The previous colonization by Gram-negative bacteria have been genetically related to infection in 70.6% and the samples colonization after infection process with genetic identity could be recovered in 75.9 % of cases. For *P. aeruginosa* clonal relationship was observed only among isolates from colonization and infection of the same patient, to *A. baumannii* clonal spread was observed between different patients in both hospitals evaluated. The presence of genes and resistance profiles were identical to those seen in infectious for long periods of colonization samples colonizing samples. The data obtained in this study show a strong association between colonization and infection of patients due to multiresistant Gram-negative bacteria and indicate that surveillance cultures or decolonization particularly in the case of *A. baumannii* can be much useful to control infections by these microorganisms.

Keywords: Multidrug-resistant bacteria. Colonization. Infection. Gram-negative bacilli. Genotypic characterization.

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas da publicação científica:

Infection Control and Hospital Epidemiology

Disponível em:

<http://www.press.uchicago.edu/ucp/journals/journal/iche.html>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	9
Epidemiologia da transmissão de patógenos no ambiente hospitalar.....	9
A origem do microrganismo para a colonização e sua relação com a infecção.....	18
Justificativa	24
Objetivos	25
Referências	26
CAPÍTULO II	36
<i>The role of colonization process in infection by multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients</i>	37
CAPÍTULO III	67
Conclusões	67
Perspectivas Futuras	67

CAPÍTULO I

Epidemiologia da transmissão de patógenos no ambiente hospitalar

O número de infecções provocadas por microrganismos resistentes a múltiplas drogas (i.e., “multiple drug resistance”, MDR) tem aumentado significativamente nas duas últimas décadas. O aumento do período de internamento, dos custos hospitalares, da mortalidade e a diminuição das opções de tratamento têm tornado a prevenção e controle das infecções hospitalares causadas por microrganismos MDR uma prioridade em todo o mundo (1;2).

Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos lançaram normas escritas pelo Comitê de Assessoria de Práticas em Saúde para Controle de Infecção abordando vigilância ativa e precauções de contato em casos de surtos ou alta incidência de microrganismos MDR para controlar a transmissão da colonização ou infecção por estes microrganismos (1). A eficácia deste controle depende de fatores como o conhecimento da origem do microrganismo que coloniza o paciente, duração da colonização e prevalência da colonização com microrganismos MDR nos pacientes de risco (3). Embora seja reconhecido que a colonização frequentemente precede a infecção, a origem do microrganismo e o modo preciso de sua transmissão são ainda aspectos pouco conhecidos (4;5).

Nos hospitais, a origem dos microrganismos MDR pode ser de natureza exógena (e.g., ambiente, outros pacientes ou equipamentos contaminados) ou endógena, quando é proveniente da própria microbiota do paciente (4;5). A presença de dispositivos médicos invasivos, a ruptura de mecanismos de defesa do hospedeiro, co-morbididades do paciente, a exposição à medicação, particularmente aos antimicrobianos de amplo espectro de ação, são exemplos de fatores que podem facilitar o processo de colonização do paciente por microrganismos MDR (6).

A transmissão de microrganismos MDR no ambiente hospitalar tem sido evidenciada por estudos de tipagem molecular. Um deles, investigando a relação clonal entre os isolados, encontrou cepas idênticas em ambientes com distâncias consideráveis dos pacientes colonizados pelo mesmo microrganismo (7).

A transmissão de agentes patogênicos de um paciente infectado ou colonizado para um paciente suscetível pode ser causada pelo ambiente e equipamentos contaminados, mas tem sido associada mais comumente às mãos dos profissionais de saúde. Por isso, a higiene das mãos é considerada a medida mais importante para a prevenção das infecções relacionadas à assistência à saúde e redução da transmissão cruzada de microrganismos MDR (8).

As mãos dos profissionais de saúde são contaminadas durante a assistência ao paciente pelo contato com feridas infectadas, secreções de drenagens e também com a pele intacta (9;10). As áreas perianais ou inguinais são as mais frequentemente colonizadas, mas regiões como axilas, tronco e extremidades superiores, incluindo as mãos, são também colonizadas. O número de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp e *Acinetobacter* spp presentes na pele pode variar de 100 a um milhão de unidades formadoras de colônias (UFC) por cm² (6).

Alguns estudos têm mostrado que microrganismos presentes em pacientes colonizados ou infectados são transferidas para as mãos dos profissionais da saúde durante os cuidados da assistência (11, 12). Um estudo, por exemplo, que investigou a contaminação das mãos dos profissionais no contato direto com o paciente, no tratamento de feridas, cuidado com cateter, assistência ventilatória e manuseio de secreções, demonstrou que o contato direto com o paciente e o cuidado do trato respiratório foram os procedimentos com maior probabilidade de contaminar as mãos dos profissionais da saúde. Os bacilos Gram-negativos foram responsáveis por 15% (54/372) dos isolados e *S. aureus* por 11% (39/372). A duração da atividade de assistência ao paciente foi fortemente relacionada com a intensidade da contaminação bacteriana das mãos dos profissionais de saúde (11).

Aproximadamente um milhão de células descamativas contendo microrganismos viáveis são dispersas no ambiente diariamente a partir da pele normal (13). Por isso, é possível que a vestimenta do paciente, roupas de cama, móveis de cabeceira e outros objetos sejam contaminados com microrganismos da microbiota da pele do paciente, particularmente por bactérias Gram-positivas, que são reconhecidamente mais resistentes à dessecação (14;15).

A transmissão de microrganismos MDR entre pacientes (i.e., transmissão cruzada) através das mãos contaminadas dos profissionais da saúde requer, obrigatoriamente, uma sequência de cinco etapas: (i) os microrganismos estão presentes na pele do paciente ou são encontrados nos fômites no ambiente em torno do paciente; (ii) os microrganismos precisam ser transferidos para as mãos dos profissionais da saúde; (iii) os microrganismos precisam sobreviver nas mãos dos profissionais da saúde por pelo menos vários minutos; (iv) a higiene ou antisepsia das mãos realizadas pelos profissionais da saúde devem ser inadequadas ou omitidas completamente, ou o agente usado deve ser inapropriado; (v) as mãos dos profissionais da saúde devem entrar em contato direto com outro paciente, ou com um fômite que deverá entrar em contato com o paciente (6). A dinâmica da contaminação é a mesma para mãos com ou sem luvas. Apesar das luvas protegerem as mãos do profissional da saúde,

a superfície da luva contaminada é uma importante fonte de transmissão de microrganismos MDR (11;16-18).

Um estudo realizado em uma unidade de terapia intensiva (UTI) no Hospital Universitário de Maringá mostrou a transferência de *Acinetobacter baumannii* MDR de pacientes para as mãos enluvadas dos profissionais de saúde em 60% dos contatos. O microrganismo foi também isolado do ambiente próximo ao paciente (18). Outro estudo demonstrou a contaminação das mãos enluvadas de enfermeiros durante a troca de curativo ou banho de leito de cinco pacientes colonizados ou infectados com *Acinetobacter baumannii* MDR. O microrganismo foi isolado em todas as amostragens das mãos enluvadas (N=14). A tipagem molecular, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase de elementos intergênicos repetitivos (i.e, “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase Chain Reaction” ERIC-PCR), mostrou que todos os isolados pertenceram ao mesmo genótipo e foram idênticos aos isolados clínicos de *A. baumannii* previamente obtidos das hemoculturas destes pacientes (17).

Após a transferência dos microrganismos do paciente para as mãos dos profissionais, eles podem sobreviver por diferentes períodos de tempo nas mãos. Por exemplo, um estudo (19) mostrou em espécies de *Acinetobacter* spp que após a contaminação dos dedos de voluntários com um inóculo de 10^4 UFC/mL, ainda pode ser encontrado $7,2 \times 10^2$ UFC/mL após 60 minutos da contaminação. Um estudo similar com enterobactérias mostrou que 50% das células de cepas de *Klebsiella* spp e de *Escherichia coli* sobreviveram após 2 min e 6 min, respectivamente (20). Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) sobreviveram por pelo menos 60 min nas mãos enluvadas e sem luvas (21). *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* foram transmitidas pelo aperto de mão por até 30 min nas mãos contaminadas com os microrganismos em suspensão em solução salina e até 180 min nas mãos contaminadas com escarro contendo os microrganismos (22).

A lavagem inadequada das mãos contaminadas pode fazer com o risco de transmissão de microrganismos continue. A técnica correta abrangendo toda superfície das mãos e punhos, a quantidade e o tipo de produto de lavar as mãos e o tempo de lavagem são fatores que influenciam na eficiência da remoção dos microrganismos (6). Problemas na higienização das mãos dos profissionais de saúde entre contato de um paciente com outro ou durante a sequência de atendimento ao paciente, em particular quando as mãos tocam em um sítio contaminado e em seguida um sítio limpo no mesmo paciente, favorece a transferência microbiana (6).

Campanhas de promoção da higienização das mãos têm mostrado uma diminuição na transmissão de patógenos e nas taxas de infecção (23). Em uma campanha educativa multifacetada, a adesão à higienização das mãos aumentou de 48% em 1994 para 66% em 1997 ($p < 0,001$). Entre outros fatores educativos desta campanha merece destaque a introdução de álcool gel na cabeceira do leito do paciente. Durante o estudo, a higiene das mãos com sabão e água manteve-se estável, mas a frequência de antissepsia das mãos com álcool gel aumentou significativamente. A taxa geral de infecção hospitalar diminuiu (prevalência de 16,9% em 1994 contra 9,9% em 1998, $p = 0,04$) e as taxas de transmissão de “methicilin-resistant *S. aureus*” (MRSA) também (de 2,16 a 0,93 episódios por 10.000 pacientes-dia $p < 0,001$). O consumo de álcool gel aumentou de 3,5L para 15,4L por mil pacientes-dia entre 1993 e 1998 ($p < 0,001$) (23).

A importância da transmissão de patógenos pelas mãos contaminadas dos profissionais de saúde está bem estabelecida. Em contraste, o grau de contaminação das superfícies do ambiente que contribui para o desenvolvimento das infecções relacionadas à assistência à saúde não está claro e as abordagens para o controle são incertas (24)

Desde 1950 são feitas normas hospitalares para controlar os patógenos presentes no ar, nas mãos, equipamentos e superfícies ambientais (25). Porém, vários estudos realizados nas décadas de 70 e 80 do século passado sugeriram que o ambiente hospitalar não era importante para a transmissão endêmica (26;27) fazendo com que as rotinas de culturas de vigilância do ambiente hospitalar fossem consideradas injustificadas e o valor de culturas durante surtos foi questionado (28;29).

Nos hospitais norte-americanos a rotina de amostragem do ambiente era de 75% em 1975 e foi reduzida a praticamente zero em 2011 (24). Informações contidas no site da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) no Brasil em 2012 [ccih.med.br] informou que o ambiente tem papel secundário na epidemiologia das infecções, exceto para doenças contagiosas por vias aéreas como a tuberculose; para patógenos que sobrevivem em ambientes especiais como *Legionella*; para *Aspergillus* quando o hospital passa por reforma na sua construção, o que facilita a disseminação deste microrganismo, ou para casos em que os preceitos básicos de higiene não sejam seguidos. As diretrizes do CDC recomendam a amostragem ambiental somente por ocasião de surtos (30). Recentemente, contudo, tem sido feita uma reavaliação do papel desempenhado pelas superfícies contaminadas na transmissão dos patógenos hospitalares (24;31;32).

A concentração de patógenos nas superfícies hospitalares está geralmente em torno de menos do que 1 a 100 UFC/cm² (33;34) e muitas vezes é detectada apenas em caldo de

enriquecimento (35;36). Concentrações maiores foram encontradas em estudos com *S. aureus*, chegando a 200 UFC/cm² tanto antes quanto depois da limpeza (37) e mais de 100 colônias de MRSA em 23% dos locais positivos pelo plaqueamento direto nos quartos de pacientes com diarreia infectados por MRSA (38). As amostragens ambientais nas superfícies hospitalares próximas aos pacientes colonizados ou infectados, feitas para certas bactérias Gram-positivas, mostraram que estes patógenos são encontrados em concentrações mais altas, suficientes para transmissão (39;40). Os pacientes infectados liberam mais patógenos no ambiente hospitalar do que os apenas colonizados (41).

A grande variação do grau de contaminação do meio ambiente pode ser devido a alguns fatores como, por exemplo, o tipo do meio de cultivo do microrganismo, a facilidade de dispersão de microrganismos pelo paciente, o método de amostragem, a facilidade de contaminação ou dificuldade de limpeza do ambiente em particular e se existe surto em andamento durante a amostragem (41). A frequência de contaminação do ambiente hospitalar por bactérias Gram-negativas mostrou ser de aproximadamente 5% a 10% (42;43).

Alguns estudos mostraram que a dose infectante de alguns patógenos pode ser baixa. Por exemplo, menos do que 15 células de *S. aureus* foram suficientes para causar infecção em lesões experimentais no homem (44) e uma célula por cm² de *Clostridium difficile* foi capaz de causar infecção em camundongos (45).

Diversos pesquisadores investigaram o tempo que os patógenos hospitalares permanecem viáveis nas superfícies e demonstraram que eles podem resistir à dessecação por períodos de 1h30min (*E. coli*) até 46 meses (VRE) conforme mostrado na ilustração 1 (46). As grandes variações encontradas na sobrevivência dos diferentes microrganismos são parcialmente devidas às características dos microrganismos e também pelas diferenças nas condições experimentais, incluindo a dose do inóculo, umidade, o meio de suspensão das células e o tipo de material da superfície (46).

Microrganismos	Tempo de sobrevivência
<i>Clostridium difficile</i> (esporos)	> 5 meses
<i>Staphylococcus aureus</i> , incluindo MRSA	7 dias a 12 meses
<i>Enterococcus</i> spp, incluindo VRE	5 dias a 46 meses
<i>Acinetobacter</i> spp	3 dias a 11 meses
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 horas a 16 meses; nas superfícies secas: 5 semanas
<i>Klebsiella</i> spp	2 horas a 30 meses
<i>Serratia marcescens</i>	3 dias a 2 meses; nas superfícies secas: 5 semanas
<i>Escherichia coli</i>	1.5 horas a 16 meses

Ilustração 1. Sobrevivência de bactérias hospitalares em superfícies.

Fonte: Kramer et. al (46).

Nos hospitais, a limpeza ou desinfecção do ambiente possui limitações para a remoção total dos microrganismos. A limpeza geralmente é realizada diariamente com o objetivo de reduzir sujidades e assegurar que o ambiente permaneça visivelmente limpo. Uma limpeza e desinfecção terminal mais rigorosa é feita quando o leito é desocupado para a segurança do próximo paciente (41).

Um problema da desinfecção é que os produtos líquidos podem danificar equipamentos, especialmente os eletrônicos e os desinfetantes a base de cloro podem corroer metais (47). Os desinfetantes podem potencialmente prejudicar usuários e seus resíduos no ambiente levar ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos além de outros efeitos prejudiciais para o ambiente (47). Por estas razões, autoridades têm questionado o uso de desinfetantes em favor dos detergentes (47). Existe uma tendência para o uso de desinfetantes nos Estados Unidos e para detergentes na Europa (47;48). No Brasil utiliza-se rotineiramente sabão ou detergente para os processos de limpeza de superfícies, sendo os desinfetantes restritos às situações específicas como, por exemplo, nas superfícies contaminadas com matéria orgânica ou com microrganismos MDR (49).

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a eficácia da desinfecção terminal e em muitos casos foi encontrado na superfície o agente patogênico que o processo tinha como objetivo eliminar (36;50-52). Por exemplo, VRE foi cultivado em 71% das 102 amostras depois da desinfecção de 17 quartos (50). MRSA foi detectado em 66% de 124 superfícies após limpeza com desinfetante-detergente (36). *A. baumannii* foi isolado de superfícies

aparentemente limpas durante surtos (51). Um estudo revelou que 27% dos quartos ficaram contaminados com *A. baumannii* ou MRSA após a desinfecção com um quaternário de amônia seguido da aplicação de hipoclorito de sódio ser repetida por quatro vezes (52).

No Brasil há poucos estudos sobre a desinfecção terminal (53). Um estudo de desinfecção de colchões hospitalares com solução detergente-desinfetante de fenol sintético avaliou as condições microbiológicas antes e depois de sua limpeza. Foram investigados 52 colchões, coletando-se 259 amostras antes e depois da limpeza. Houve redução de positividade em apenas quatro placas e 255 continuaram positivas mesmo após a desinfecção (54). Outro estudo comparou duas técnicas de limpeza de colchões com álcool 70%, uma com movimento unidirecional e a outra com movimentos circulares. A última técnica apresentou melhores resultados na redução da contagem microbiana, embora não tenha se mostrado eficaz na eliminação dos microrganismos (55).

O papel das superfícies contaminadas na transmissão dos patógenos pode ser estimado avaliando-se o risco do paciente em contrair certos patógenos quando internados em quartos onde o ocupante anterior era infectado ou colonizado com o mesmo patógeno, principalmente quando a limpeza e desinfecção do quarto é feita de forma inadequada (41). Por exemplo, um estudo (56) mostrou que 28% dos 57 novos ocupantes foram infectados por *A. baumannii* e que 26% dos 82 novos pacientes sofreram infecção por *P. aeruginosa*. Este aumento do risco de aquisição de patógenos foi descrito anteriormente para *C. difficile* (57), VRE (58-60), MRSA (60) (Ilustração 2).

Um estudo verificou o aumento de risco de adquirir VRE com o ocupante anterior do leito colonizado ou infectado com este microrganismo em três situações: quando o paciente foi admitido no mesmo leito (risco relativo de 4,3), quando o paciente foi admitido no leito vizinho (risco relativo de 3,8) e quando o paciente foi admitido no mesmo leito a mais de duas semanas da ocupação do paciente colonizado ou infectado com VRE (risco relativo de 2,7) (Ilustração 2) (58).

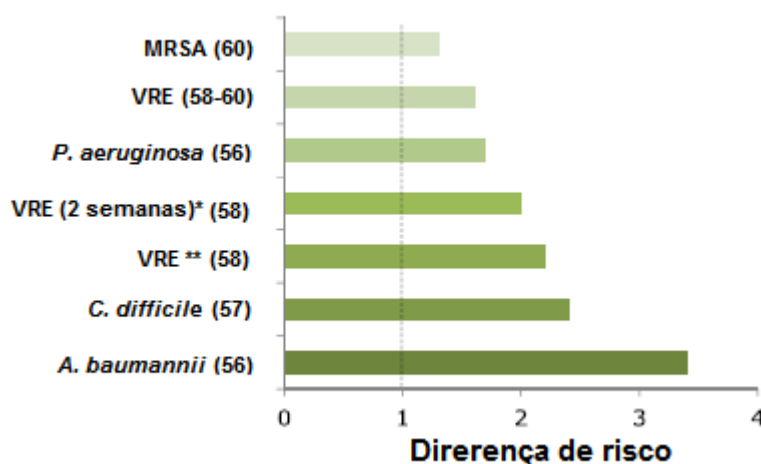


Ilustração 2. O aumento de risco de aquisição de patógenos associado com a colonização ou infecção no ocupante anterior do quarto.

* Ocupante anterior do leito infectado ou colonizado com VRE a mais de duas semanas da admissão. ** Ocupante anterior do leito infectado ou colonizado com VRE.

Fonte: Otter *et al.* (41).

Um estudo recente (61) investigou o risco do paciente adquirir *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) quando o ocupante anterior do quarto tinha isolados positivos destes microrganismos. Os resultados sugeriram que não houve associação da colonização ou infecção do ocupante subsequente do quarto por estas bactérias. Entretanto, os resultados da tipagem molecular mostraram que 18% dos pacientes adquiriram a mesma cepa bacteriana obtida do ocupante anterior (61).

Estudos que permitem a avaliação dos riscos associados a contaminação ambiental independentem de variáveis de confusão comuns de infecção hospitalar, como a idade do paciente, co-morbidades e duração da estadia. Além disso, porque os pacientes como a fonte do microrganismo já receberam alta, a aquisição do patógeno pelo novo paciente é mais provável ter vindo a partir de superfícies contaminadas, seja diretamente das superfícies ou pelas mãos dos profissionais de saúde (41).

Alguns estudos têm investigado a transferência de agentes patogênicos de superfícies para as mãos ou luvas dos profissionais de saúde na ausência de contato direto com o paciente (Ilustração 3). O contato das mãos com uma superfície contaminada apresenta o mesmo risco de adquirir MRSA, VRE (62;63) e *C. difficile* (64) do que o contato com um paciente colonizado ou infectado. Um estudo, por exemplo, mostrou que a contaminação das mãos com VRE foi de 10% tanto para contato direto com os doentes quanto para o contato com as

superfícies em torno do paciente (63). Um fato importante é que a adesão à higienização das mãos é mais provável de ocorrer após o contato direto com o paciente em comparação com o contato com o ambiente do paciente. Isto significa que a contaminação das mãos a partir do ambiente pode persistir por mais tempo, resultando em uma importante rota de transmissão de microrganismos nos hospitais (65).

Contato direto com o paciente	Contato apenas com superfícies
	52% de 44 PCS adquiriram VRE em suas mãos ou luvas (63)
45% de 50 PCS adquiriram MRSA em suas mãos enluvadas (62)	40% de 50 PCS adquiriram MRSA em suas mãos enluvadas (62)
50% de 30 PCS adquiriram <i>Clostridium difficile</i> em suas mãos enluvadas (64)	50% de 30 PCS adquiriram <i>C. difficile</i> em suas mãos enluvadas (64)
Adesão à higienização das mãos: 80% (65)	Adesão à higienização das mãos: 50% (65)

Ilustração 3. Transferência de bactérias presentes nas superfícies para as mãos dos profissionais de saúde.

PCS, Prestadores de cuidados de saúde

Fonte: Otter *et al.* (41).

As mãos dos profissionais podem também contaminar o ambiente. Um estudo, baseado na propagação de um marcador (i.e., DNA de planta), foi realizado inoculando-se o DNA em um dos seis cabos de telefone de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de oito leitos (66). Dentro de 4 horas, o marcador foi identificado nas superfícies ambientais, nas mãos dos profissionais de saúde em toda a unidade e nos seis telefones. Apesar da propagação do DNA vegetal não necessariamente representar com precisão a propagação de um microrganismo patogênico, ela mostra um quadro de transmissão dinâmica e rápida, envolvendo as superfícies ambientais e as mãos dos profissionais (66).

Campanhas hospitalares promovendo a melhoria da limpeza e desinfecção têm mostrado uma diminuição na prevalência de colonização ou infecção por microrganismos MDR. Um estudo de coorte retrospectivo em 10 UTIs de um hospital dos Estados Unidos introduziu três intervenções de limpeza: técnica de dois baldes para limpeza, um "feedback" utilizando um detector de carga bacteriana com luz ultravioleta e aumento da educação em serviço de limpeza para o pessoal. Foi verificado que a aquisição de MRSA e VRE caiu,

respectivamente, 50% e 27% durante os períodos de intervenção. O risco associado com o ocupante anterior foi diminuído para MRSA mas não para VRE (67).

Outro estudo (68) realizado em seis unidades de alto risco em um hospital dos EUA avaliou o impacto da introdução de vapor de peróxido de hidrogênio para a desinfecção terminal nos quartos de pacientes infectados com microrganismos MDR. Pacientes internados em quartos assim descontaminados foram menos propensos a adquirir qualquer microrganismo (64% de redução) e a infecção ou colonização com VRE foi reduzida em 80%.

A origem da colonização microbiana e sua relação com a infecção

Levando em conta os fatores de saúde do paciente, a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos e a epidemiologia de transmissão dos patógenos no ambiente hospitalar, alguns autores decidiram investigar as rotas de colonização endógenas ou exógenas e relacionar a origem da colonização com as amostras de infecção.

Estudos da década de 1990 investigando a transmissão cruzada se basearam na identidade de genótipos e cronologia, considerando transmissão cruzada se um paciente adquiriu a mesma cepa encontrada em outro paciente no mesmo período de internamento. Os estudos relacionando o ocupante anterior do quarto e sua possível contaminação do ambiente são mais recentes (5;40).

Um estudo realizado por Kropec *et al.* (1993) em uma UTI, avaliou as rotas de colonização como endógenas ou exógenas para *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Foram coletadas, com auxílio de swab, amostras das mucosas retal e nasal, do couro cabeludo e secreção traqueal dos pacientes no momento da admissão e dois dias após a internação. Culturas das mãos, roupas e swab nasal dos profissionais de saúde e do ambiente foram também realizadas. As taxas de pacientes colonizados com *P. aeruginosa* e *S. aureus* na admissão foram de, respectivamente, 5% e 37%. Durante a hospitalização, 10 (6,5%) pacientes foram colonizados por *P. aeruginosa* e 7 (4,5%) por *S. aureus*. A colonização adquirida do ambiente hospitalar foi primeiramente detectada em swabs retais para *P. aeruginosa* e em swabs nasais para *S. aureus*. Os resultados encontrados sugeriram que a colonização inerente do próprio paciente desempenha um papel mais importante no desenvolvimento de infecções do que a colonização adquirida a partir de fontes exógenas. Neste estudo, apenas uma amostra do ambiente foi positiva *P. aeruginosa* (69).

P. aeruginosa é encontrada frequentemente contaminando o encanamento da rede de distribuição de água. Uma revisão de estudos publicados entre 1998 e 2005 mostrou a presença deste microrganismo em 10% a 68% das torneiras hospitalares e que 14% a 50% dos

episódios de colonização ou infecção dos pacientes foram associados aos genótipos encontrados na água (70).

Bergmans *et al.* (1998) encontraram 11 clones em 118 isolados de *P. aeruginosa*. Um clone estava associado a 8 pacientes, 2 clones envolveram três pacientes cada e os outros 8 foram clones individuais de cada paciente. Oito dos 16 (50%) pacientes colonizados e 2 dos 8 (25%) casos de pneumonia associada à ventilação mecânica foram associadas à transmissão cruzada pela avaliação cronológica e identidade clonal dos isolados (5).

Bonten *et al.* (1999) investigaram uma taxa endêmica de colonização por *P. aeruginosa* do trato respiratório superior de pacientes de uma UTI. Os resultados mostraram que 34% dos pacientes já estavam colonizados na admissão, 24% foram colonizados por um genótipo diferente daquele encontrado no trato intestinal, 13% foram colonizados com o mesmo genótipo do trato intestinal e 8% foram colonizados por transmissão cruzada. Em 21% dos pacientes nenhuma rota de colonização pode ser demonstrada. O grande número de isolamento de *P. aeruginosa* nesta unidade foi devido à admissão contínua de pacientes colonizados e à pressão seletiva de antibióticos ao invés da transmissão cruzada (40).

Outro estudo (71) com *P. aeruginosa* em pacientes de UTI encontrou um clone representando 61% dos isolados, envolvendo 46% dos pacientes. A transmissão cruzada, considerada evitável, foi calculada e representou pelo menos 59,5% dos episódios de colonização ou infecção.

Hu *et al.* (2010) estudaram o papel da origem endógena ou exógena de *P. aeruginosa* na colonização ou infecção de pacientes com ventilação mecânica em uma UTI neonatal. Duas vezes por semanas foram coletadas, com auxílio de “swab”, amostras do reto e da orofaringe dos neonatos, além da secreção traqueal e aspirado gástrico. Culturas de superfícies do ambiente foram realizadas a cada 5 dias. Dos pacientes com ventilação mecânica, 7,8% já estavam colonizados por *P. aeruginosa* antes da intubação e 24% foram colonizados após a intubação. Dos que adquiriram *P. aeruginosa* após intubação, com base nos padrões de similaridade de genótipos, 64,5% provavelmente foram colonizados por transmissão exógena, enquanto que 35,5% tiveram colonização de origem endógena. O primeiro sítio a ser colonizado foi o trato respiratório superior em 92,3% dos casos e 70% dos pacientes tiveram a colonização do trato respiratório causado por fontes exógenas (i.e., outros pacientes ou superfícies ambientais) (72).

Ainda neste estudo (72), os fatores associados à colonização ou infecção por *P. aeruginosa* foram: baixo peso ao nascer, ventilação mecânica por tempo superior a oito dias, uso prévio de ampicilina e uso de cefalosporina de segunda geração. Embora a colonização

por *P. aeruginosa* seja silenciosa, subclínica e não invasiva, ela teve um impacto na incidência de pneumonia associada à ventilação; 25% dos pacientes apresentaram esta infecção por *P. aeruginosa* (72). Quanto às cepas que causaram infecção pulmonar, 50% (4/8) eram endógenas e 50% (4/8) exógenas, sendo que das exógenas 3 cepas eram de outros pacientes e apenas uma veio de um isolado do ambiente, o que significa que 87,5% (7/8) delas vieram de isolados clínicos. Isto foi explicado devido ao provável aumento de virulência da cepa endógena em virtude da pressão seletiva dos antibióticos e do hospedeiro. Na comparação dos testes de sensibilidade, os isolados clínicos se mostraram mais resistentes que os isolados ambientais (72).

Outro estudo atribuiu 100% da colonização com MRSA e 50% de *P. aeruginosa* a partir de fontes exógenas (73).

Sem considerar a origem do microrganismo, de modo geral, diversos estudos mostraram que para bactérias Gram-positivas como MRSA e VRE, 30 a 90% dos pacientes colonizados não apresentam infecção clínica (74). Pouco deste assunto é conhecido em relação aos microrganismos Gram-negativos MDR. Acredita-se que a porcentagem de pacientes colonizados com estes microrganismos que não desenvolvem infecção clínica é menor quando comparada aos Gram-positivos (75;76). A maioria dos estudos com Gram-negativos abordam *P. aeruginosa*, mostrando que 16% a 38% dos pacientes colonizados por este microrganismo irão desenvolver pneumonia durante o internamento (77).

Um estudo mostrou que colonização traqueal por *A. baumannii* multirresistente foi um fator preditivo de pneumonia, associada à ventilação mecânica, causada por este microrganismo (78).

Um estudo encontrou que 22% (9/41) dos pacientes colonizados com *E. coli* ou *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs desenvolveram infecção por estas bactérias. A colonização foi considerada um fator de risco independente para a infecção ($p=0,002$) (79).

A importância de culturas de vigilância recomendadas para reduzir a transmissão de patógenos hospitalares durante surtos ou situações endêmicas constitui ainda matéria de debate (1;80). Uma vigilância ativa é definida como o rastreamento periódico de pacientes com risco de adquirir infecção por bactérias MDR (75). A identificação do paciente colonizado ou infectado por microrganismos MDR permite que medidas de controle sejam tomadas, como o isolamento do paciente, precauções de contato e direcionamento do serviço de limpeza e desinfecção. No caso de colonização seguida de infecção, a escolha dos antibióticos pode ser baseada no microrganismo isolado anteriormente. As taxas de colonização podem também, entre outros aspectos, servir como um indicador da qualidade

dos cuidados ao paciente (75). No entanto, a coleta e o processamento das culturas de vigilância são trabalhosos e caros (81), sendo necessário sempre avaliar, a relação custo benefício (75).

Culturas de vigilância para detecção de pacientes colonizados com bactérias Gram-negativas MDR são recomendadas, mas não têm sido amplamente adotadas, em parte devido à escassez dos dados sobre a acurácia de sua identificação (82). Um estudo com *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos mostrou que as culturas de vigilância em apenas um local do corpo (e.g., reto, orofaringe ou garganta) não foi sensível para detectar estas bactérias. Devido a alta proporção de colonização, o estudo sugeriu também que o tempo, dinheiro e energia deveriam ser melhor empregados na redução da transmissão cruzada através da melhoria das práticas de atendimento ao paciente (83).

Culturas de vigilância realizadas para reduzir a transmissão dos patógenos durante surtos teve sucesso para *Acinetobacter* spp (84) e fracasso para *Enterobacter aerogenes* (85). A eficácia de culturas de vigilância na redução endêmica de enterobactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) foi pobre em um estudo (86) e boa em outro estudo com *Klebsiella* spp (87).

A estratégia de culturas de vigilância constante dos pacientes para detectar microrganismos MDR aliada a uma boa comunicação com os médicos e pessoal de enfermagem permitiu um monitoramento da incidência de infecção hospitalar e impediu que ocorressem episódios de surtos ou infecção cruzada em um hospital terciário de Nova Deli (88).

Outro estudo encontrou que amostras de colonização de mucosas (retal e orofaringe) e de aspirado traqueal positivas para bactérias Gram-negativas tinham baixo valor preditivo positivo (4%) para prever sepse tardia em uma UTI neonatal. Embora as culturas de mucosas tenham se mostrado ineficientes para prever a sepse tardia, foi verificado uma maior sensibilidade das amostras de vigilância para encontrar *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Stenotrophomonas* spp. e *Pseudomonas* spp., sugerindo que a triagem destes microrganismos em um surto poderiam oferecer uma oportunidade para melhorar as medidas de controle de infecção e permitir o início precoce da terapia antibiótica apropriada (81).

Um estudo com pacientes da unidade de queimados com lesão inalatória e alta incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica, as culturas de vigilância foram excelentes para prever infecção com microrganismos MDR, incluindo principalmente *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp. A sensibilidade e especificidade das culturas de vigilância

para prever a etiologia de microrganismos MDR em pneumonia subsequente foi de 83% e 96,2% (89).

A duração da colonização por bactérias MDR é um fator muito importante. Durante o período da colonização, o paciente continua com o risco de sofrer infecção por este microrganismo e permanece também como fonte de transmissão para outros pacientes.

Para as bactérias Gram-positivas como MRSA e VRE vários estudos mostraram que a colonização pode persistir por 6 a 12 meses (90-93). A duração da colonização com microrganismos Gram-negativos parece ser mais curta (90;94;95). Um estudo, por exemplo, verificou que entre os pacientes com longa permanência na UTI, os pacientes colonizados com bactérias Gram-negativas MDR foram quatro vezes mais propensos a ter uma descolonização espontânea quando comparados com aqueles colonizados com MRSA ou VRE (90). Em outros estudos, no entanto, observou-se uma colonização prolongada (63 a 356 dias) para bacilos Gram-negativos MDR (96;97).

Um estudo com amostras *E. coli* com susceptibilidade reduzida a fluoroquinolonas encontrou uma colonização média de 80 dias (8 a 172 dias) (97). Na China, onde os antibióticos são usados sem regulamentação e a taxa de *E. coli* ESBL em isolados clínicos é cerca de 60%, um estudo feito com indivíduos saudáveis, realizado com estudantes de medicina, mostrou que a duração da colonização das fezes por *E. coli* produtora de ESBL foi em média 59 dias (14 a 112 dias) (98). Outro estudo envolvendo recém-nascidos colonizados com bactérias produtoras de ESBL mostrou que os neonatos permaneceram colonizados durante 1 ano com *Klebsiella* spp. e 4 meses com *Serratia marcescens* após a alta hospitalar (99). Estes dados são importantes também para relacionar a disseminação das bactérias multirresistentes na comunidade.

A descolonização de bactérias MDR é feita pela técnica de descontaminação digestiva seletiva (DDS) em situações especiais, como por exemplo, em pacientes de onco-hematologia internados em unidades de tratamento intensivo. Baseia-se na administração de antibióticos de amplo espectro em um curto período de tempo. Regimes recentes trazem também a técnica de descontaminação orofaríngea seletiva (DOS) (100). Estes regimes têm mostrado uma redução na mortalidade e reduzido as taxas de bacteremia em até três vezes quando comparada ao grupo controle (101).

A descolonização com o uso de antimicrobianos levanta a questão do risco da seleção de microrganismos resistentes (102), sendo estudada apenas em países com baixa incidência de microrganismos MDR (103;104), pois o risco pode ser maior onde a incidência destes microrganismos é alta.

Um estudo realizado em Israel, um país com alta incidência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), testou DDS com um regime de 7 dias de gentamicina mais colistina. No sétimo dia as bactérias não eram detectáveis nas fezes de 61% dos que estavam no regime contra 16% do grupo placebo. Nenhuma emergência de resistência a gentamicina ou colistina foi observada (105). No entanto este regime é utilizado com cautela devido ao possível desenvolvimento de resistência.

A descolonização da pele tem se mostrado eficaz para redução da densidade bacteriana (106;107), reduzindo o risco de transmissão horizontal de bactérias para outros pacientes e a incidência de infecções relacionadas à assistência à saúde (108). Com esta finalidade, o banho com gluconato de clorexidina (clorexidina) é o mais utilizado. A clorexidina é um biocida com amplo espectro de ação atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A clorexidina tem se mostrado um antisséptico eficaz desde 1970 (107;109-111).

A maioria dos estudos de descolonização da pele foi feita para prevenir infecção com MRSA e VRE e na comparação com o uso de clorexidina com sabonete e água ou panos sem agentes químicos a clorexidina mostrou uma redução superior a 50% no risco de infecção associada à corrente sanguínea (112).

Quatro estudos realizados com *A. baumannii* antes e após a descolonização com clorexidina mediram o impacto sobre a taxa de infecção. Um estudo mostrou uma redução significativa da incidência de infecção associada à corrente sanguínea (113) e outro na incidência de colonização e pneumonia associada à ventilação mecânica por este microrganismo (114). Os outros dois estudos relataram não haver benefícios (115;116).

JUSTIFICATIVA

Atualmente, encontra-se reconhecido que em pacientes hospitalizados a colonização por microrganismos multirresistentes é um processo prévio à infecção. Embora a investigação da origem da colonização (endógena ou exógena) seja difícil e complexa, nos últimos anos alguns estudos têm mostrado que além da transmissão dos patógenos hospitalares pelas mãos dos profissionais de saúde, o ambiente pode também constituir um importante reservatório de microrganismos MDR.

É reconhecido que os pacientes infectados contaminam mais o ambiente a seu redor do que os pacientes colonizados, entretanto, dependendo do tipo de microrganismo, a colonização pode ter um papel tão importante quanto à infecção na manutenção deste microrganismo no ambiente.

A partir da avaliação de dados de hospitais de nossa região (Hospital Universitário de Londrina, Santa Casa de Maringá e Hospital Universitário de Maringá), percebemos que muitas espécies de bactérias que infectaram os pacientes também foram isoladas previamente destes pacientes, colonizando o intestino, axilas ou cavidade oral. Os isolados de colonização possuíam o mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos daqueles isolados de infecção. Outro fato é um estudo realizado em nosso laboratório que demonstrou a presença de um clone endêmico de *A. baumannii* no Hospital Universitário de Maringá presente nos quadros de colonização e infecção dos pacientes no ambiente próximo ao paciente e também nas luvas (18). Outro estudo, também realizado em nosso laboratório, demonstrou que uma cepa de *A. baumannii* MDR isolada previamente em hemoculturas de cinco pacientes foi recuperada em todas as amostragens das mãos enluvadas dos profissionais de saúde depois de realizar o banho de leito ou a troca de curativos destes pacientes (17).

Em relação aos microrganismos Gram-positivos o papel da colonização na infecção de pacientes hospitalizados encontra-se amplamente conhecido, entretanto, existem poucos estudos sobre esse assunto em relação aos bacilos Gram-negativos. Baseado neste ponto e considerando que nos últimos anos tem sido valorizada a presença da colonização em relação à infecção, decidimos investigar em dois hospitais qual a relação entre a colonização e a infecção de bacilos Gram-negativos e identificar os principais mecanismos de resistência destes microrganismos aos agentes antimicrobianos.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a importância da colonização no processo de infecção por bactérias Gram-negativas multirresistentes em pacientes internados nos hospitais Santa Casa de Maringá e Hospital Universitário de Maringá.

ESPECÍFICOS

Selecionar pacientes internados no Hospital Santa Casa, no período de 2009 a 2010 e no Hospital Universitário de Maringá durante 2011 e 2012, com culturas de vigilância e isolados clínicos positivos de bactérias Gram-negativas.

Confirmar a pureza e determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados das culturas de vigilância através da técnica de disco difusão.

Caracterizar molecularmente pela técnica de ERIC-PCR todos os isolados utilizados neste estudo e confirmar a identidade das cepas pela técnica REP PCR.

Detectar molecularmente os principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos dos bacilos Gram-negativos envolvidos no processo de colonização e infecção.

Avaliar a associação entre as amostras de colonização e de infecção dos diferentes bacilos Gram-negativos estudados.

REFERÊNCIAS

- (1) Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control* 2007 Dec;35(10 Suppl 2):S165-S193.
- (2) Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, *et al.* NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008 Nov;29(11):996-1011.
- (3) Harris AD, McGregor JC, Furuno JP. What infection control interventions should be undertaken to control multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *Clin Infect Dis* 2006 Sep 1;43 Suppl 2:S57-S61.
- (4) Talon D, Mulin B, Rouget C, Bailly P, Thouverez M, Viel JF. Risks and routes for ventilator-associated pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Mar;157(3 Pt 1):978-84.
- (5) Bergmans DC, Bonten MJ, van Tiel FH, Gaillard CA, van der GS, Wilting RM, *et al.* Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax* 1998 Dec;53(12):1053-8.
- (6) Pittet D, Allegranzi B, Sax H, Dharan S, Pessoa-Silva CL, Donaldson L, *et al.* Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect Dis* 2006 Oct;6(10):641-52.
- (7) Corona-Nakamura AL, Miranda-Novales MG, Leanos-Miranda B, Portillo-Gomez L, Hernandez-Chavez A, nthor-Rendon J, *et al.* Epidemiologic Study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res* 2001 May;32(3):238-42.
- (8) Boyce JM, Pittet D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/Association for Professionals in Infection Control/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 2002 Oct 25;51(RR-16):1-45, quiz.
- (9) Lowbury EJ. Gram-negative bacilli on the skin. *Br J Dermatol* 1969;81:Suppl.
- (10) Larson EL, McGinley KJ, Foglia AR, Talbot GH, Leyden JJ. Composition and antimicrobial resistance of skin flora in hospitalized and healthy adults. *J Clin Microbiol* 1986 Mar;23(3):604-8.
- (11) Pittet D, Dharan S, Touveneau S, Sauvan V, Perneger TV. Bacterial contamination of the hands of hospital staff during routine patient care. *Arch Intern Med* 1999 Apr 26;159(8):821-6.

- (12) Sanderson PJ, Weissler S. Recovery of coliforms from the hands of nurses and patients: activities leading to contamination. *J Hosp Infect* 1992 Jun;21(2):85-93.
- (13) Noble WC. Dispersal of skin microorganisms. *Br J Dermatol* 1975 Oct;93(4):477-85.
- (14) Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, *et al.* Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* 1994 May;32(5):1148-53.
- (15) McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989 Jan 26;320(4):204-10.
- (16) Fox MK, Langner SB, Wells RW. How good are hand washing practices? *Am J Nurs* 1974 Sep;74(9):1676-8.
- (17) Silva SR, da Rosa NM, Wingeter MA, Pinto NB, Tognim MC, Garcia LB, *et al.* Hand contamination during hospital patient care. *Int J Infect Dis* 2012 Aug;16(8):e641-e642.
- (18) dos Santos Saalfeld SM, Fukita VG, as Siqueira VL, Cardoso CL, Botelho GL, Bronharo Tognim MC. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. *J Hosp Infect* 2009 Aug;72(4):365-8.
- (19) Musa EK, Desai N, Casewell MW. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. *J Hosp Infect* 1990 Apr;15(3):219-27.
- (20) Fryklund B, Tullus K, Burman LG. Survival on skin and surfaces of epidemic and non-epidemic strains of enterobacteria from neonatal special care units. *J Hosp Infect* 1995 Mar;29(3):201-8.
- (21) Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995 Oct;16(10):577-81.
- (22) Doring G, Jansen S, Noll H, Grupp H, Frank F, Botzenhart K, *et al.* Distribution and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in a hospital ward. *Pediatr Pulmonol* 1996 Feb;21(2):90-100.
- (23) Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, Touveneau S, *et al.* Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. *Infection Control Programme. Lancet* 2000 Oct 14;356(9238):1307-12.
- (24) Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011 Jul;32(7):687-99.
- (25) Williams REOBGLSR. *Hospital Infections: Causes and Prevention*. Lloyd-Luke . 2013. London, 1966. Ref Type: Generic

- (26) Weber DO, Gooch JJ, Wood WR, Britt EM, Kraft RO. Influence of operating room surface contamination on surgical wounds: a prospective study. *Arch Surg* 1976 Apr;111(4):484-8.
- (27) Maki DG, Alvarado CJ, Hassemer CA, Zilz MA. Relation of the inanimate hospital environment to endemic nosocomial infection. *N Engl J Med* 1982 Dec 16;307(25):1562-6.
- (28) Mallison GF, Haley RW. Microbiologic sampling of the inanimate environment in U.S. hospitals, 1976-1977. *Am J Med* 1981 Apr;70(4):941-6.
- (29) McGowan JE, Jr. Environmental factors in nosocomial infection-a selective focus. *Rev Infect Dis* 1981 Jul;3(4):760-9.
- (30) Sehulster L, Chinn RY. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep* 2003 Jun 6;52(RR-10):1-42.
- (31) Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect* 2009 Dec;73(4):378-85.
- (32) Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control* 2010 Jun;38(5 Suppl 1):S25-S33.
- (33) Boyce JM, Havill NL, Otter JA, McDonald LC, Adams NM, Cooper T, *et al.* Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on *Clostridium difficile* environmental contamination and transmission in a healthcare setting. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008 Aug;29(8):723-9.
- (34) Rutala WA, Katz EB, Sherertz RJ, Sarubbi FA, Jr. Environmental study of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic in a burn unit. *J Clin Microbiol* 1983 Sep;18(3):683-8.
- (35) Boyce JM, Potter-Bynoe G, Chenevert C, King T. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997 Sep;18(9):622-7.
- (36) French GL, Otter JA, Shannon KP, Adams NM, Watling D, Parks MJ. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *J Hosp Infect* 2004 May;57(1):31-7.
- (37) Cooper RA, Griffith CJ, Malik RE, Obee P, Looker N. Monitoring the effectiveness of cleaning in four British hospitals. *Am J Infect Control* 2007 Jun;35(5):338-41.
- (38) Boyce JM, Havill NL, Otter JA, Adams NM. Widespread environmental contamination associated with patients with diarrhea and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of the gastrointestinal tract. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007 Oct;28(10):1142-7.

- (39) Duckro AN, Blom DW, Lyle EA, Weinstein RA, Hayden MK. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Arch Intern Med* 2005 Feb 14;165(3):302-7.
- (40) Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 Oct;160(4):1212-9.
- (41) Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control* 2013 May;41(5 Suppl):S6-11.
- (42) Getchell-White SI, Donowitz LG, Groschel DH. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989 Sep;10(9):402-7.
- (43) Lemmen SW, Hafner H, Zolldann D, Stanzel S, Lutticken R. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *J Hosp Infect* 2004 Mar;56(3):191-7.
- (44) FOSTER WD, HUTT MS. Experimental staphylococcal infections in man. *Lancet* 1960 Dec 24;2(7165):1373-6.
- (45) Lawley TD, Clare S, Deakin LJ, Goulding D, Yen JL, Raisen C, *et al.* Use of purified *Clostridium difficile* spores to facilitate evaluation of health care disinfection regimens. *Appl Environ Microbiol* 2010 Oct;76(20):6895-900.
- (46) Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130.
- (47) Dettenkofer M, Block C. Hospital disinfection: efficacy and safety issues. *Curr Opin Infect Dis* 2005 Aug;18(4):320-5.
- (48) Rutala WA, Weber DJ. The benefits of surface disinfection. *Am J Infect Control* 2005 Sep;33(7):434-5.
- (49) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ANVISA. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde– Limpeza e Desinfecção de Superfícies. 1. ed. Brasília, 2010. 120 p. Disponível em: <http://www2.rio.rj.gov.br/governo/vigilanciasanitaria/manuais/manual_seguranca_paciente_anvisa_2010.pdf>. Acesso em: 04 novembro 2013.
- (50) Eckstein BC, Adams DA, Eckstein EC, Rao A, Sethi AK, Yadavalli GK, *et al.* Reduction of *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. *BMC Infect Dis* 2007;7:61.

- (51) Corbella X, Pujol M, Argerich MJ, Ayats J, Sendra M, Pena C, *et al.* Environmental sampling of *Acinetobacter baumannii*: moistened swabs versus moistened sterile gauze pads. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999 Jul;20(7):458-60.
- (52) Manian FA, Griesenauer S, Senkel D, Setzer JM, Doll SA, Perry AM, *et al.* Isolation of *Acinetobacter baumannii* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from hospital rooms following terminal cleaning and disinfection: can we do better? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011 Jul;32(7):667-72.
- (53) Oliveira AD, Damasceno QS. O papel do ambiente hospitalar na disseminação de bactérias resistentes. *Rev Epidemiol Control Infect* 2012 Jan;2(1):28-31.
- (54) Andrade D, Angerami ELS, Padovani CR. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. *Rev Saúde Pública* 2000;34 (2):163-9.
- (55) Ferreira AM, Andrade D, Rigotti MA, Ferrareze Ferreira MV. Condições de limpeza de superfícies próximas ao paciente, em uma unidade de terapia intensiva. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* 2011; 19(3):[08 telas].
- (56) Nseir S, Blazejewski C, Lubret R, Wallet F, Courcol R, Durocher A. Risk of acquiring multidrug-resistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2011 Aug;17(8):1201-8.
- (57) Shaughnessy MK, Micielli RL, DePestel DD, Arndt J, Strachan CL, Welch KB, *et al.* Evaluation of hospital room assignment and acquisition of *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011 Mar;32(3):201-6.
- (58) Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, Barefoot L, Hansjosten K, Vue PM, *et al.* Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2008 Mar 1;46(5):678-85.
- (59) Martinez JA, Ruthazer R, Hansjosten K, Barefoot L, Snyderman DR. Role of environmental contamination as a risk factor for acquisition of vancomycin-resistant enterococci in patients treated in a medical intensive care unit. *Arch Intern Med* 2003 Sep 8;163(16):1905-12.
- (60) Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch Intern Med* 2006 Oct 9;166(18):1945-51.
- (61) Ajao AO, Johnson JK, Harris AD, Zhan M, McGregor JC, Thom KA, *et al.* Risk of acquiring extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* from prior room occupants in the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013 May;34(5):453-8.
- (62) Stiefel U, Cadnum JL, Eckstein BC, Guerrero DM, Tima MA, Donskey CJ. Contamination of hands with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after contact with environmental surfaces and after contact with the skin of colonized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011 Feb;32(2):185-7.
- (63) Hayden MK, Blom DW, Lyle EA, Moore CG, Weinstein RA. Risk of hand or glove contamination after contact with patients colonized with vancomycin-resistant

- enterococcus or the colonized patients' environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008 Feb;29(2):149-54.
- (64) Guerrero DM, Nerandzic MM, Jury LA, Jinno S, Chang S, Donskey CJ. Acquisition of spores on gloved hands after contact with the skin of patients with *Clostridium difficile* infection and with environmental surfaces in their rooms. *Am J Infect Control* 2012 Aug;40(6):556-8.
 - (65) Randle J, Arthur A, Vaughan N. Twenty-four-hour observational study of hospital hand hygiene compliance. *J Hosp Infect* 2010 Nov;76(3):252-5.
 - (66) Oelberg DG, Joyner SE, Jiang X, Laborde D, Islam MP, Pickering LK. Detection of pathogen transmission in neonatal nurseries using DNA markers as surrogate indicators. *Pediatrics* 2000 Feb;105(2):311-5.
 - (67) Datta R, Platt R, Yokoe DS, Huang SS. Environmental cleaning intervention and risk of acquiring multidrug-resistant organisms from prior room occupants. *Arch Intern Med* 2011 Mar 28;171(6):491-4.
 - (68) Passaretti CL, Otter JA, Reich NG, Myers J, Shepard J, Ross T, *et al.* An evaluation of environmental decontamination with hydrogen peroxide vapor for reducing the risk of patient acquisition of multidrug-resistant organisms. *Clin Infect Dis* 2013 Jan;56(1):27-35.
 - (69) Kropec A, Huebner J, Riffel M, Bayer U, Benzing A, Geiger K, *et al.* Exogenous or endogenous reservoirs of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infections in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Med* 1993;19(3):161-5.
 - (70) Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005 Jun;33(5 Suppl 1):S41-S49.
 - (71) Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Med* 2007 Jul;33(7):1155-61.
 - (72) Hu HB, Huang HJ, Peng QY, Lu J, Lei XY. Prospective study of colonization and infection because of *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients at a neonatal intensive care unit in China. *Am J Infect Control* 2010 Nov;38(9):746-50.
 - (73) Slekovec C, Talon D, Bertrand X. Which screening is needed in intensive care units: MRSA or *Pseudomonas aeruginosa*? *J Hosp Infect* 2010 Aug;75(4):329-30.
 - (74) Weintrob AC, Roediger MP, Barber M, Summers A, Fieberg AM, Dunn J, *et al.* Natural history of colonization with Gram-negative multidrug-resistant organisms among hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010 Apr;31(4):330-7.
 - (75) Harris AD, Nemoy L, Johnson JA, Martin-Carnahan A, Smith DL, Standiford H, *et al.* Co-carriage rates of vancomycin-resistant *Enterococcus* and extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria among a cohort of intensive care unit patients:

- implications for an active surveillance program. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004 Feb;25(2):105-8.
- (76) Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, *et al.* Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2001 Aug;27(8):1263-8.
 - (77) Hayon J, Figliolini C, Combes A, Trouillet JL, Kassis N, Dombret MC, *et al.* Role of serial routine microbiologic culture results in the initial management of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Jan 1;165(1):41-6.
 - (78) Hernandez-Torres A, Garcia-Vazquez E, Gomez J, Canteras M, Ruiz J, Fernandez-Rufete A, *et al.* [Carbapenem and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonisation/infection: epidemiology and factors associated with infection]. *Med Clin (Barc)* 2010 Sep 18;135(9):389-96.
 - (79) Oguz MS, Arda B, Erdem HA, Uyar M, Tunger A, Sipahi OR, *et al.* [Risk factors for gastrointestinal colonization by ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in anaesthesiology and reanimation intensive care unit]. *Mikrobiyol Bul* 2013 Apr;47(2):223-9.
 - (80) Ben-David D, Maor Y, Keller N, Regev-Yochay G, Tal I, Shachar D, *et al.* Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010 Jun;31(6):620-6.
 - (81) Parm U, Metsvaht T, Sepp E, Ilmoja ML, Pisarev H, Pauskar M, *et al.* Mucosal surveillance cultures in predicting Gram-negative late-onset sepsis in neonatal intensive care units. *J Hosp Infect* 2011 Aug;78(4):327-32.
 - (82) Snyder GM, D'Agata EM. Diagnostic accuracy of surveillance cultures to detect gastrointestinal colonization with multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Am J Infect Control* 2012 Jun;40(5):474-6.
 - (83) DalBen MF, Oliveira MS, Garcia CP, Lobo RD, Costa SF, Toscano CM, *et al.* Swab cultures across three different body sites among carriers of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* species: a poor surveillance strategy. *J Hosp Infect* 2010 Apr;74(4):395-6.
 - (84) D'Agata EM, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000 Sep;21(9):588-91.
 - (85) Piagnerelli M, Kennes B, Brogniez Y, Deplano A, Govaerts D. Outbreak of nosocomial multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a geriatric unit: failure of isolation contact, analysis of risk factors, and use of pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000 Oct;21(10):651-3.
 - (86) Troche G, Joly LM, Guibert M, Zazzo JF. Detection and treatment of antibiotic-resistant bacterial carriage in a surgical intensive care unit: a 6-year prospective survey. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005 Feb;26(2):161-5.

- (87) Benenson S, Levin PD, Block C, Adler A, Ergaz Z, Peleg O, *et al.* Continuous surveillance to reduce extended-spectrum beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* colonization in the neonatal intensive care unit. *Neonatology* 2013;103(2):155-60.
- (88) Arya SC, Agarwal N, Agarwal S, Murali G, Chattri U. A combined culture-based methodology for surveillance of hospital-acquired infections and timely remedial action in a tertiary care hospital in Delhi, India. *Am J Infect Control* 2013 Nov;41(11):1129-30.
- (89) Brusselaers N, Logie D, Vogelaers D, Monstrey S, Blot S. Burns, inhalation injury and ventilator-associated pneumonia: value of routine surveillance cultures. *Burns* 2012 May;38(3):364-70.
- (90) Pacio GA, Visintainer P, Maguire G, Wormser GP, Raffalli J, Montecalvo MA. Natural history of colonization with vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and resistant Gram-negative bacilli among long-term-care facility residents. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003 Apr;24(4):246-50.
- (91) Scanvic A, Denic L, Gaillon S, Giry P, Andreumont A, Lucet JC. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. *Clin Infect Dis* 2001 May 15;32(10):1393-8.
- (92) Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Farr BM. Duration of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002 Apr;23(4):207-11.
- (93) Muder RR, Brennen C, Wagener MM, Vickers RM, Rihs JD, Hancock GA, *et al.* Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med* 1991 Jan 15;114(2):107-12.
- (94) Oethinger M, Jellen-Ritter AS, Conrad S, Marre R, Kern WV. Colonization and infection with fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among cancer patients: clonal analysis. *Infection* 1998 Nov;26(6):379-84.
- (95) Perea S, Hidalgo M, Arcediano A, Ramos MJ, Gomez C, Hornedo J, *et al.* Incidence and clinical impact of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in the faecal flora of cancer patients treated with high dose chemotherapy and ciprofloxacin prophylaxis. *J Antimicrob Chemother* 1999 Jul;44(1):117-20.
- (96) O'Fallon E, Gautam S, D'Agata EM. Colonization with multidrug-resistant Gram-negative bacteria: prolonged duration and frequent cocolonization. *Clin Infect Dis* 2009 May 15;48(10):1375-81.
- (97) Lautenbach E, Tolomeo P, Mao X, Fishman NO, Metlay JP, Bilker WB, *et al.* Duration of outpatient fecal colonization due to *Escherichia coli* Isolates with decreased susceptibility to fluoroquinolones: longitudinal study of patients recently discharged from the hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Nov;50(11):3939-43.
- (98) Li B, Zhong Y, Fu XC, Qiu YH, Wang SY, Yang AJ, *et al.* Duration of stool colonization in healthy medical students with extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Aug;56(8):4558-9.

- (99) Strenger V, Feierl G, Resch B, Zarfel G, Grisold A, Masoud-Landgraf L, *et al.* Fecal carriage and intrafamilial spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae following colonization at the neonatal ICU. *Pediatr Crit Care Med* 2013 Feb;14(2):157-63.
- (100) Ruppe E, Andreumont A. Causes, consequences, and perspectives in the variations of intestinal density of colonization of multidrug-resistant enterobacteria. *Front Microbiol* 2013;4:129.
- (101) Oostdijk EA, de Smet AM, Kesecioglu J, Bonten MJ. The role of intestinal colonization with Gram-negative bacteria as a source for intensive care unit-acquired bacteremia. *Crit Care Med* 2011 May;39(5):961-6.
- (102) Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010 Sep;10(9):597-602.
- (103) de Smet AM, Kluytmans JA, Blok HE, Mascini EM, Benus RF, Bernards AT, *et al.* Selective digestive tract decontamination and selective oropharyngeal decontamination and antibiotic resistance in patients in intensive-care units: an open-label, clustered group-randomised, crossover study. *Lancet Infect Dis* 2011 May;11(5):372-80.
- (104) Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011 Jul;17(7):1216-22.
- (105) Saidel-Odes L, Polachek H, Peled N, Riesenbergs K, Schlaeffer F, Trabelsi Y, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination using oral gentamicin and oral polymyxin E for eradication of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012 Jan;33(1):14-9.
- (106) Paulson DS. Efficacy evaluation of a 4% chlorhexidine gluconate as a full-body shower wash. *Am J Infect Control* 1993 Aug;21(4):205-9.
- (107) Edmiston CE, Jr., Seabrook GR, Johnson CP, Paulson DS, Beausoleil CM. Comparative of a new and innovative 2% chlorhexidine gluconate-impregnated cloth with 4% chlorhexidine gluconate as topical antiseptic for preparation of the skin prior to surgery. *Am J Infect Control* 2007 Mar;35(2):89-96.
- (108) Vernon MO, Hayden MK, Trick WE, Hayes RA, Blom DW, Weinstein RA. Chlorhexidine gluconate to cleanse patients in a medical intensive care unit: the effectiveness of source control to reduce the bioburden of vancomycin-resistant enterococci. *Arch Intern Med* 2006 Feb 13;166(3):306-12.
- (109) Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. *Clin Infect Dis* 2008 Jan 15;46(2):274-81.

- (110) Rosenberg A, Alatary SD, Peterson AF. Safety and efficacy of the antiseptic chlorhexidine gluconate. *Surg Gynecol Obstet* 1976 Nov;143(5):789-92.
- (111) Kaiser AB, Kernodle DS, Barg NL, Petracek MR. Influence of preoperative showers on staphylococcal skin colonization: a comparative trial of antiseptic skin cleansers. *Ann Thorac Surg* 1988 Jan;45(1):35-8.
- (112) Karki S, Cheng AC. Impact of non-rinse skin cleansing with chlorhexidine gluconate on prevention of healthcare-associated infections and colonization with multi-resistant organisms: a systematic review. *J Hosp Infect* 2012 Oct;82(2):71-84.
- (113) Borer A, Gilad J, Porat N, Megrelesvilli R, Saidel-Odes L, Peled N, *et al.* Impact of 4% chlorhexidine whole-body washing on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* skin colonisation among patients in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect* 2007 Oct;67(2):149-55.
- (114) Evans HL, Dellit TH, Chan J, Nathens AB, Maier RV, Cuschieri J. Effect of chlorhexidine whole-body bathing on hospital-acquired infections among trauma patients. *Arch Surg* 2010 Mar;145(3):240-6.
- (115) Popovich KJ, Hota B, Hayes R, Weinstein RA, Hayden MK. Effectiveness of routine patient cleansing with chlorhexidine gluconate for infection prevention in the medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009 Oct;30(10):959-63.
- (116) Popovich KJ, Hota B, Hayes R, Weinstein RA, Hayden MK. Daily skin cleansing with chlorhexidine did not reduce the rate of central-line associated bloodstream infection in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Med* 2010 May;36(5):854-8.

CAPÍTULO II

Artigo: A importância da colonização no processo de infecção por bactérias Gram-negativas multirresistentes em pacientes hospitalizados

O Manuscrito abaixo foi elaborado segundo as normas da revista *Infection Control and Hospital Epidemiology* em anexo

Título: A importância da colonização no processo de infecção por bactérias Gram-negativas multirresistentes em pacientes hospitalizados

Title: The role of colonization process in infection by multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients

Authors names and affiliations: Thais Marcelle Bosisio Trevizoli,¹ Thatiany Cevallos Menegucci,¹ Miriam Nicea Zarpelon,¹ Lourdes Botelho Garcia,² Celso Luíz Cardoso,² *Maria Cristina Bronharo Tognim²

1. Postgraduate in Bioscience and Pathophysiology Program, State University of Maringá, Avenue Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil;

2. Laboratory of Microbiology, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Avenue Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

***Correspondent author:** Maria Cristina Bronharo Tognim

Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790. CEP 87020-900. Maringá, Paraná, Brasil.

E-mail: mcbtognim@uem.br.

Phone: 55-44-3011-4952. Fax: 55-44-3011-4860.

RESUMO

OBJETIVO O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre a colonização e a infecção por bacilos Gram-negativos multirresistentes em pacientes hospitalizados em dois hospitais do sul do Brasil.

RESULTADOS. O patógeno da colonização prévia por bactérias Gram-negativas foi molecularmente relacionado com o da infecção em 70,6% dos pacientes e amostras de mesmo clone foram encontradas na colonização após o processo infeccioso em 75,9% dos casos. A colonização pela mesma cepa foi encontrada até 88 dias antes e 296 dias após o processo infeccioso. Nosso estudo também detectou a presença de um clone endêmico de *Acinetobacter baumannii* nos dois hospitais e amostras idênticas deste microrganismo foram encontradas no ambiente ao redor do leito de um paciente infectado.

CONCLUSÕES. Este estudo indica que culturas de vigilância e medidas como a descolonização do paciente e melhor direcionamento da limpeza e desinfecção podem ser muito úteis no controle de infecções por estes microrganismos.

Palavras – chave: bactérias multirresistentes, colonização, infecção, bacilos Gram-negativos, caracterização genotípica.

INTRODUÇÃO

A colonização de pacientes hospitalizados por microrganismos multirresistentes aos agentes antimicrobianos tem sido diretamente associada à infecções por estes microrganismos.^{1,2}

Há mais de 20 anos, Weinstein estimou que as fontes de transmissão de patógenos envolvidos em infecções em unidades de terapia intensiva incluem a microbiota dos pacientes, as mãos contaminadas do pessoal hospitalar, o uso de antibióticos além do ambiente contaminado.³

O ambiente hospitalar durante muito tempo foi considerado não significativo para a transmissão de patógenos,^{4,5} mas na última década um notável progresso tem sido feito no entendimento de que ele desempenha um papel importante na transmissão de patógenos hospitalares,⁶ com estudos mostrando que os patógenos dos pacientes podem contaminar o ambiente, permanecer viáveis por longos períodos, resistirem à desinfecção e limpeza, e ser encontrados em concentrações suficientes para transmissão.⁷

A contaminação de superfícies por bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina, enterococos resistentes a vancomicina ou ainda *Clostridium difficile*,⁶ que são reconhecidamente mais resistentes a dessecação⁸ tem sido bastante investigada,^{6,8} no entanto, a frequência de contaminação de superfícies dos quartos e a importância disto para bacilos Gram-negativos tem sido pouco estudada.

Para *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes, um estudo demonstrou um aumento significativo no número de pacientes colonizados internados em quartos previamente ocupados por pacientes colonizados ou infectados por estes microrganismos, porém estes patógenos não foram caracterizados geneticamente.⁹ Ainda outros estudos demonstraram que o desenvolvimento de pneumonia por *Pseudomonas*

*aeruginosa*¹⁰ e *Acinetobacter baumannii*¹¹ foram diretamente associadas à colonização prévia do trato respiratório superior por estes microrganismos.

Estes fatos indicam que o conhecimento da origem da colonização e da contaminação do ambiente ao redor do paciente são fatores que auxiliam nas medidas de controle destas infecções por microrganismos MDR. Baseados nestes fatos, o presente estudo investigou a relação entre a colonização e infecção por bacilos Gram-negativos MDR e a presença destas bactérias em situação endêmica em dois hospitais do sul do Brasil.

MÉTODOS

Amostras bacterianas

Foram selecionadas para o estudo amostras de colonização e infecção de bacilos Gram-negativos isoladas de pacientes internados no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010 no hospital Santa Casa de Maringá e de janeiro de 2011 a dezembro de 2012 no Hospital Universitário de Maringá (HUM). Foram incluídos pacientes que possuíssem a mesma espécie bacteriana tanto em amostras de colonização (isoladas a partir de swabs retal, nasal ou oral) como amostras clínicas (isoladas de processos infecciosos). Para um paciente foram coletadas amostras do ambiente ao redor do leito.

As amostras de colonização foram coletadas na admissão conforme indicação do médico plantonista e para todos os pacientes que apresentassem indicação de internamento em enfermaria ou Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) ou ainda se tivesse estado internado no mesmo ou em outro hospital nos últimos 30 dias. As coletas foram realizadas semanalmente de todos os pacientes internados nas UTIs por todo o período do internamento. Os swabs retais eram passados previamente em 10 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) contendo um disco de 10µg de ertapenem e este caldo era posteriormente plaqueado em ágar MacConkey.

Identificação dos isolados e Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

Os isolados clínicos foram identificados e testados quanto à susceptibilidade por método automatizado Phoenix® - BD (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, EUA) no laboratório de cada hospital. Para as amostras bacterianas isoladas de colonização a identificação foi realizada por provas bioquímicas convencionais. Os testes de sensibilidade para antimicrobianos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e cefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona e cefepima) destes isolados foram realizados pelo método de disco difusão, conforme preconizado pelo "Clinical and Laboratory Standards Institute".^{12,13}

Tipagem molecular

A tipagem molecular foi realizada pela técnica "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus–Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)" segundo Silbert *et al.*¹⁴ A interpretação dos padrões de bandas gerados pelo ERIC-PCR foi realizada utilizando-se o "software" Bionumerics, versão 6,5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Para análise da similaridade dos isolados foi utilizado o coeficiente de Dice.¹⁵ Os isolados foram considerados do mesmo clone quando o coeficiente de similaridade foi igual ou maior que 0,93.¹⁴ A identidade clonal foi ainda confirmada por um segundo método "Repetitive Extragenic Palindromic–Polymerase Chain Reaction (REP-PCR)".¹⁶

Deteção Molecular dos Marcadores de Resistência

A análise molecular dos principais mecanismos de resistência para os beta-lactâmicos foi realizada pela metodologia de PCR multiplex segundo Poirel *et al.*¹⁷ onde foram pesquisados os genes *bla*_{GIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} para todos os bacilos Gram-negativos estudados. Adicionalmente, para amostras de *Acinetobacter* spp. foram ainda pesquisados os genes *bla*_{oxa51-like}, *bla*_{oxa23-like}, *bla*_{oxa24-like}, *bla*_{oxa58-like} e *bla*_{oxa143-like}, segundo Woodford *et al.*¹⁸ e para as enterobactérias os genes ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}) segundo Monstein *et al.*¹⁹

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 69 pacientes dos dois hospitais. Oito pacientes tiveram mais de um microrganismo isolado e no total 197 amostras foram analisadas. Os números de amostras dos microrganismos selecionados/paciente foram: 81 *Pseudomonas aeruginosa*/32; 83 *Acinetobacter baumannii*/30; 14 *Klebsiella pneumoniae*/7; 10 *Enterobacter* spp./4, 4 *Stenotrophomonas maltophilia*/2; 3 *Escherichia coli*/1 e 3 *Serratia marcescens*/1. Dos 69 pacientes estudados, 63 (91,3%) foram internados pelo menos uma vez na UTI.

Todas as amostras com clones relacionados pela técnica de ERIC-PCR foram confirmadas pela técnica de REP-PCR. Exemplos do padrão de bandas gerado por estas técnicas estão mostrados nas Figuras 1a e 1b.

A distribuição dos clones em relação a data de isolamento, sítio de infecção e principais marcadores de resistência para *P. aeruginosa* e *A. baumannii* do hospital Santa Casa estão demonstrados nas figuras 2 e 3. Para o HUM, estes dados são mostrados nas figuras 4 (*P. aeruginosa*), 5 (*A. baumannii*), 6 (*S. maltophilia*), 7 (*E. coli*) 8 (*S. marcescens*), 9 (*K. pneumoniae*) e 10 (*Enterobacter* spp).

A obtenção da amostra de colonização previamente à amostra de infecção por bactérias de mesma espécie ocorreu em 34 pacientes, sendo que em 24 (70,59%) foi verificada uma identidade clonal entre a amostra de colonização e a amostra de infecção. Amostras de bactérias de mesma espécie colonizando os pacientes após a infecção clínica foram isoladas em 29 pacientes dos quais 22 (75,86%) apresentaram perfil molecular com similaridade maior a 93%, sendo, portanto, consideradas de mesma origem clonal.

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos clones em relação ao tempo entre os isolados de colonização e infecção das diferentes bactérias estudadas.

O principal material clínico para o isolamento de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. maltophilia* foi o aspirado traqueal, para *K. pneumoniae* foi secreção abdominal e para

Enterobacter spp. e *E. coli* foi a urina. Não houve relação direta entre o tipo de material clínico e a similaridade das amostras.

A mesma cepa pôde ser encontrada colonizando o paciente até 88 dias antes da infecção e até 296 dias após a infecção. Ambos os períodos foram referentes a amostras de *P. aeruginosa* e no caso da colonização prévia, o paciente esteve internado em todo tempo na UTI; no caso da colonização posterior o paciente recebeu alta e retornou ao hospital colonizado pela mesma cepa.

Quanto aos isolados de *A. baumannii* selecionados neste estudo, os provenientes do hospital HUM apresentaram um mesmo clone envolvendo 41,67% (15/36) dos isolados, durante um período de 222 dias. Um segundo clone foi responsável por 16,67% (6/36) dos isolados em um período de 303 dias e um terceiro por 13,89% (5/36) em 269 dias. No hospital Santa Casa, um clone incluiu 23,4 % (11/47) das amostras de *A. baumannii*, em um período de 409 dias. Os isolados dos demais microrganismos foram caracterizados por policlonalidade.

Em um paciente além da coleta do material clínico aspirado traqueal foram também coletadas amostras do ambiente a redor: bomba de infusão, grade do leito, monitor cardíaco e bancada. Todas as amostras foram positivas para *A. baumannii* e foram relacionadas clonalmente.

O aspirado traqueal foi analisado como possível fonte de contaminação para outros sítios (Tabela 2). Os principais materiais clínicos com identidade com aspirado traqueal foi urina para *P. aeruginosa* e *E. coli* e sangue para *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

Alguns pacientes mostraram positividade nas culturas de ponta de cateter. Foi verificado identidade clonal em todas as amostras de ponta de cateter e sangue. As amostras foram isoladas no mesmo dia ou com um dia de diferença, com exceção de uma amostra de ponta de cateter que foi isolada 11 dias após a amostra de sangue (HUMAc43 e HUMAc41

Figura 5). Os isolados de ponta de cateter também tiveram identidade clonal com amostras de secreção abdominal (2/2), aspirado traqueal (3/6) e swab retal (3/5).

Em relação á sensibilidade aos antimicrobianos, 71,08% (59/83) das amostras de *A. baumannii* possuíam resistência plena ou intermediária à pelo menos um dos antimicrobianos carbapenêmicos. Para *P. aeruginosa* e enterobactérias esta taxa foi de 29,63% (24/81) e 24,14% (7/29), respectivamente. Para as cefalosporinas de amplo espectro, a taxa de resistência plena ou intermediária de *A. baumannii* foi de 98,8% (82/83), *P. aeruginosa* de 59,26% (48/81), e enterobactérias de 75,86% (22/29) (Tabela 3).

Todas as amostras de *A. baumannii* apresentaram o gene *bla*_{OXA51-like} e 72,23% (60/83) apresentaram também o gene *bla*_{OXA23-like}. Para as enterobactérias, todas as amostras apresentaram o gene *bla*_{TEM}, 58,62% (17/29) das amostras apresentou também o gene *bla*_{CTX-M} e uma amostra foi verificada também a presença do gene *bla*_{SHV}. Nenhuma amostra foi apresentou genes de metalo beta-lactamases.

Dos pacientes que apresentaram colonização e infecção pela mesma cepa, 25% (11/44) mostraram alteração de sensibilidade entre suas amostras. Um paciente foi colonizado com uma bactéria resistente que se mostrou sensível na infecção e nos demais casos as amostras eram sensíveis e posteriormente apresentaram resistência. Quanto à presença dos marcadores genotípicos de resistência, 4 (9,1%) pacientes com amostras idênticas clonalmente apresentaram diferença. Destes, 3 tinham amostras de *A. baumannii* prévia contendo o gene *bla*_{OXA51-like} e amostras posteriores contendo os genes *bla*_{OXA51-like} e *bla*_{OXA23-like}, em apenas um desses casos a colonização era prévia, com 3 dias de diferença da amostra clínica. O outro paciente tinha amostra de *K. pneumoniae*, apresentando o gene *bla*_{CTX-M} na amostra de secreção abdominal e não apresentando no swab retal coletado 4 dias após.

DISCUSSÃO

A importância de culturas de vigilância recomendadas para reduzir a transmissão de patógenos hospitalares durante surtos ou situações endêmicas constitui ainda matéria de debate.^{20,21} Culturas de vigilância para detecção de pacientes colonizados com bactérias Gram-negativas MDR não têm sido amplamente adotadas, em parte devido à escassez dos dados sobre a acurácia de sua identificação.²²

Alguns autores indicam que a colonização em um sítio pode não conter os mesmos microrganismos de outro sítio, por exemplo, colonização de vias aéreas superiores pode ser diferente da colonização do trato digestivo²³ e outros sugerem que para maior sensibilidade 2 ou mais sítios devem ser pesquisados.²⁴ Embora nossos resultados em grande parte continham amostras de colonização referentes a apenas um sítio, eles demonstraram que a maioria dos pacientes (70,6%) apresentou colonização prévia pela mesma cepa isolada no sítio infeccioso e ainda que pelo menos 75,9% dos pacientes continuaram colonizados pela mesma cepa que causou a infecção.

Isolados geneticamente idênticos foram recuperados colonizando o paciente por longos períodos, até 296 dias após o quadro infeccioso, comprovando que o paciente pode constituir uma importante fonte de transmissão de colonização ou infecção de bactérias Gram-negativas MDR para pacientes e profissionais da saúde.

Para *Pseudomonas aeruginosa*, encontramos em nosso estudo, colonização prévia com amostra do mesmo clone ao da infecção em 65% dos pacientes. A maioria dos pacientes apresentou amostra clínica proveniente de aspirado traqueal e amostra de colonização de swab retal. Um estudo²³ investigou a colonização do trato respiratório superior em um hospital onde *P. aeruginosa* era endêmica. Através da análise das culturas de swabs retal e de orofaringe encontrou que 34% dos pacientes já estavam colonizados no seu trato respiratório na admissão, 13% foram colonizados no trato respiratório com o mesmo genótipo do trato

intestinal do momento da admissão, 24% foram colonizados por um genótipo diferente daquele encontrado no trato intestinal e 8% foram colonizados por transmissão cruzada.

No presente estudo, verificamos uma alta similaridade entre os isolados de colonização e infecção por *P.aeruginosa* (Figuras 2 e 4), entretanto as amostras isoladas de diferentes pacientes foram distintas. Apenas 4 dos 32 pacientes infectados tiveram a mesma cepa isolada de outro paciente. Alguns estudos também encontraram que a colonização inerente do próprio paciente por *P.aeruginosa* desempenha um papel mais importante no desenvolvimento de infecções do que a colonização adquirida no ambiente hospitalar.^{23,25}

Pesquisas relataram que *P. aeruginosa* pode sobreviver de 6 horas a 16 meses no ambiente hospitalar, uma delas encontrou que em superfícies secas ela permaneceu viável até 5 semanas.²⁶ A ocorrência disseminação desta bactéria tem sido mais encontrada quando ela é encontrada no ambiente associada a saídas de água. Uma revisão de estudos publicados entre 1998 e 2005 mostrou que entre 9,7% a 68,1% das torneiras estavam contaminadas com *P. aeruginosa* e entre 14,2% e 50% dos episódios de colonização ou infecção dos pacientes hospitalizados foram associados aos genótipos encontrados na água.²⁷ Esta disseminação e a sobrevivência de *P.aeruginosa* não foram observadas em nosso estudo uma vez que foi apenas verificada a correlação entre as cepas de cada paciente em particular e que para este microrganismo não tivemos isolamentos positivos em culturas do ambiente hospitalar.

Embora a resistência aos carbapenêmicos verificada para *P.aeruginosa* tenha sido de 29,6% nenhum gene de metalo β -lactamase foi encontrados entre os isolados em nosso estudo.

No caso de *A. baumannii* verificamos uma maior taxa de identidade clonal entre as cepas de colonização prévia e infecção (80%) sendo ainda evidenciado em um dos hospitais (Figura 4) uma alta frequência de transmissão cruzada. Na maioria dos pacientes, como verificado para *P.aeruginosa*, a amostra clínica de maior frequência foi o aspirado traqueal

entretanto a maioria das amostras de colonização foi proveniente de swabs nasal e oral. Entre os isolados de *A. baumannii* foi detectado 72,2% de amostras positivas para o gene *bla*_{OXA23-like} responsável pela produção de carbapenemase OXA 23.

Em nossos dados verificamos a presença de *A. baumannii* contaminando o ambiente ao redor de um paciente infectado por este microrganismo. Este fato também foi evidenciado em outros estudos,²⁸ até mesmo após desinfecção.²⁹ Um deles pesquisou as superfícies do quarto em que o paciente tinha história recente ou remota de infecção por *A. baumannii* multirresistente²⁸ e encontrou que 48% dos quartos foram positivos para *A. baumannii* em pelo menos um local do ambiente. A amostra do ambiente foi geneticamente semelhante a do paciente em 85% dos casos e os pacientes com história recente (menos de 2 meses) de infecção não foram mais propensos a contaminar o ambiente do que os pacientes com história remota. Este é um dado importante, já que em nosso estudo encontramos que o paciente infectado por *A. baumannii* continua colonizado pela mesma bactéria (88,9% dos casos) por longos períodos (e.g., 113 dias). Este pode ser um dos fatores que contribuiu para a disseminação clonal de *A. baumannii* multirresistente já descrita por pesquisadores de nossa equipe em um dos hospitais (HUM).³⁰ Outros estudos já demonstraram que *A. baumannii* pode sobreviver por longos períodos²⁶ no ambiente hospitalar devido a sua resistência à dessecação³¹.

No presente estudo a mesma cepa de *A. baumannii* pode ser encontrada em até 409 dias de diferença entre as amostras ScAc01 e ScAc95 isoladas de aspirado traqueal no hospital Santa Casa (Figura 3). Um outro fato que pode contribuir para a permanência de *A. baumannii* são as mãos contaminadas dos profissionais de saúde que podem transferir os patógenos entre os pacientes e o ambiente. Outro estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que uma cepa de *A. baumannii* MDR isolada previamente em hemoculturas de

cinco pacientes foi recuperada em todas as amostragens das mãos enluvasdas dos profissionais de saúde depois de realizar o banho de leito ou a troca de curativos destes pacientes.³²

Dois pacientes em nosso estudo apresentaram identidade entre as amostras de colonização retal e aspirado traqueal para *S. maltophilia* (figura 6). Este patógeno tem sido associado a infecções do trato respiratório especialmente em pacientes imunocomprometidos.³³

Quanto às enterobactérias, todas as amostras investigadas em nosso estudo apresentaram pelo menos um gene β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) (Figuras 7– 10). O pequeno número de amostras não tornou possível verificar disseminação entre diferentes pacientes para estes microrganismos; contudo para *K. pneumoniae* foi encontrado dois clones envolvendo dois pacientes cada.

A disseminação clonal das enterobactérias tem sido pouco estudada porque se acreditava que elas não sobreviviam bem nas superfícies.³⁴ Um estudo encontrou a presença de enterobactérias produtoras de ESBL em 4% (19/470) das superfícies hospitalares pesquisadas, das quais 89% eram *K. pneumoniae*.³⁵ Outro estudo (com 6 quartos e 3 pacientes positivos para *K. pneumoniae* ESBL) encontrou 4 de 18 sítios contaminados.³⁴ Os autores sugeriram que embora a contaminação ambiental não seja tão comum como nas bactérias Gram-positivas, frequentes toques com as mãos nas superfícies adjacentes dos pacientes colonizados e banheiros em comum são um reservatório negligenciado de *K. pneumoniae*.³⁴

O tempo de sobrevivência de *K. pneumoniae* nas superfícies varia de 2 horas a 30 meses.²⁶ Um estudo avaliou o risco de adquirir *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBL quando o paciente anterior do quarto tinha isolados positivos para ESBL. Os resultados mostraram que 18% dos pacientes adquiriram a mesma cepa bacteriana obtida do ocupante anterior mas este resultado não foi considerado significativo.³⁶ Em nosso estudo devido ao

pequeno número de pacientes estudados para enterobactérias não podemos inferir sobre a transmissão destas amostras.

Foi também verificado no presente estudo que o aspirado traqueal pode ser uma possível fonte de contaminação para demais sítios (Tabela 2). Encontramos que quando o aspirado traqueal era prévio a infecção em outro material clínico, houve identidade clonal entre as amostras em 78,3 % dos casos. A maioria dos pacientes intubados necessitam de cuidados de higiene traqueal frequentes.³⁷ Estes procedimentos resultam na produção e disseminação de gotículas. Um estudo mediu a distância destas gotículas, encontrando uma distância média de 60 ± 39 cm (intervalo de 25 a 168 cm) do tubo traqueal.³⁷ Também foi encontrado que os cuidados do trato respiratório é um dos cuidados que mostram a maior probabilidade de contaminar as mãos dos profissionais.³⁸ Outro estudo verificou que as bactérias presentes no escarro têm um maior tempo de transferência (até 180 minutos) do microrganismo pelas mãos dos profissionais quando comparadas com contaminação em suspensão salina (até 30 minutos).³⁹

A contaminação do ambiente pelas gotículas de aspirado traqueal e transferência dos patógenos no mesmo paciente, quando o profissional toca um sítio contaminado e em seguida um sítio limpo, pode favorecer a contaminação de outros sítios assim como o ambiente.

Cateteres intravenosos são importantes fontes de bacteremia e causadores de injúrias infecciosas no local da inserção.⁴⁰ Em nosso estudo verificamos que houve similaridade genética entre os microrganismos isolados de ponta de cateter e o sangue e secreção abdominal. Também pode ser verificada identidade entre amostra de swab retal e ponta de cateter ou ainda de secreção traqueal e ponta de cateter. Embora sejam poucas as amostras de ponta de cateter, a similaridade encontrada entre os isolados de ponta de cateter e diversos outros sítios alertam para o fato que a colonização do paciente pode ser um fator de risco para colonização de ponta de cateter e posterior infecção de corrente sanguínea.

Foi ainda observado neste estudo que em 22,73% dos pacientes que apresentaram colonização e infecção pela mesma cepa bacteriana, houve diferenças no perfil de resistência aos beta-lactâmicos entre as duas amostras, e em 9,1% dos casos foi encontrada a aquisição de genes de resistência no segundo isolado.

Um ponto importante nos estudos de relação entre a colonização e a infecção é a importância do ambiente ou ainda dos profissionais da saúde como parte deste contexto. Uma limitação de nosso estudo foi não ter obtido amostras dos profissionais da saúde e ter analisado poucos isolados do ambiente hospitalar, mas independente deste fato, o presente estudo demonstrou existir uma grande associação entre a colonização e a infecção de pacientes por bactérias Gram negativas MDR e indica que culturas de vigilância ou ainda a descolonização, principalmente de *A. baumannii*, e melhor direcionamento da limpeza e desinfecção possam ser muito úteis no controle de infecções por estes microrganismos.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro. O projeto recebeu apoio financeiro da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Potenciais conflitos de interesse. Todos os autores relatam nenhum conflito de interesses relevante para este artigo.

REFERÊNCIAS

- (1) Weinstock DM, Conlon M, Iovino C et al. Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant *Enterococcus* early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007 May;13(5):615-21.
- (2) Maraqa NF, Aigbivbalu L, Masnita-Iusan C et al. Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection among infants at a level III neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 2011 February;39(1):35-41.
- (3) Weinstein RA. Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. *Am J Med* 1991 September 16;91(3B):179S-84S.
- (4) Weber DO, Gooch JJ, Wood WR, Britt EM, Kraft RO. Influence of operating room surface contamination on surgical wounds: a prospective study. *Arch Surg* 1976 April;111(4):484-8.
- (5) Maki DG, Alvarado CJ, Hassemer CA, Zilz MA. Relation of the inanimate hospital environment to endemic nosocomial infection. *N Engl J Med* 1982 December 16;307(25):1562-6.
- (6) Weber DJ, Rutala WA. Understanding and preventing transmission of healthcare-associated pathogens due to the contaminated hospital environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013 May;34(5):449-52.
- (7) Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011 July;32(7):687-99.

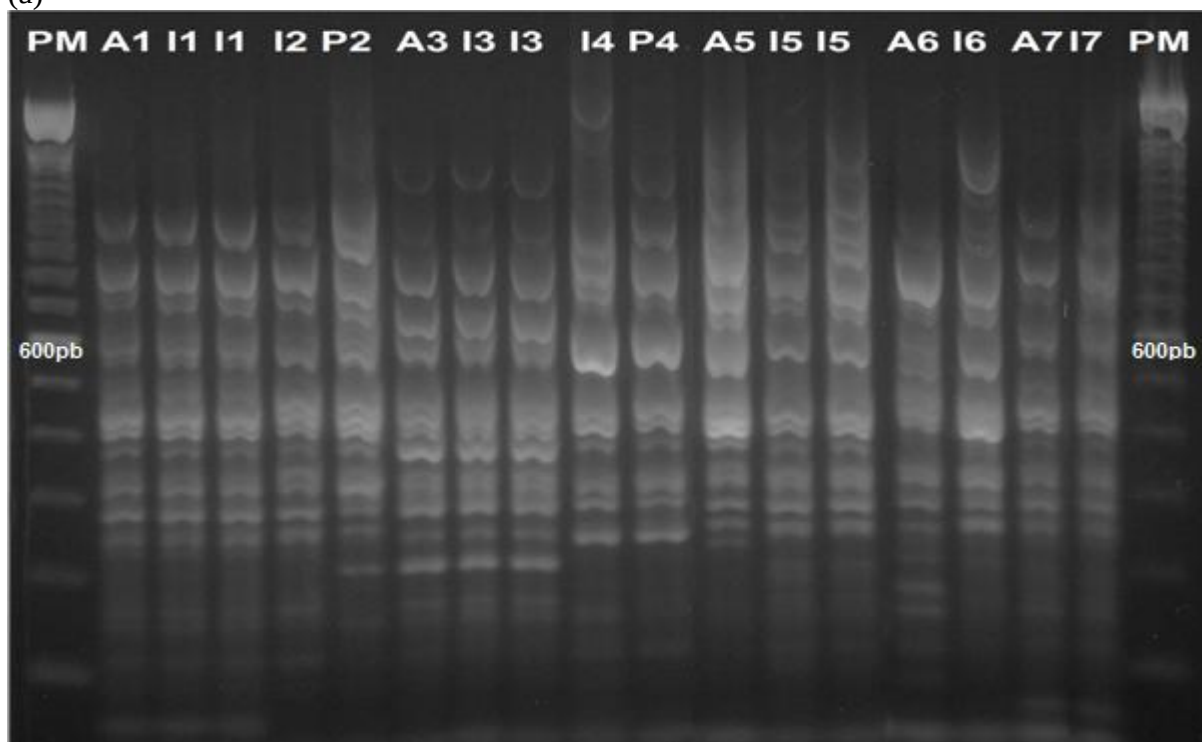
- (8) Pittet D, Allegranzi B, Sax H et al. Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect Dis* 2006 October;6(10):641-52.
- (9) Nseir S, Blazejewski C, Lubret R, Wallet F, Courcol R, Durocher A. Risk of acquiring multidrug-resistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2011 August;17(8):1201-8.
- (10) Hu HB, Huang HJ, Peng QY, Lu J, Lei XY. Prospective study of colonization and infection because of *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients at a neonatal intensive care unit in China. *Am J Infect Control* 2010 November;38(9):746-50.
- (11) Hernandez-Torres A, Garcia-Vazquez E, Gomez J et al. [Carbapenem and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonisation/infection: epidemiology and factors associated with infection]. *Med Clin (Barc)* 2010 September 18;135(9):389-96.
- (12) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for disk susceptibility tests. Eleventh edition, document M02-A11. Wayne (PA): *CLSI*;
- (13) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Third informational supplement, document M100-S23. Wayne (PA): *CLSI*; 2013.
- (14) Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004 October;25(10):847-51.
- (15) van BA, Struelens M, de VA, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2001 July;14(3):547-60.

- (16) Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991 December 25;19(24):6823-31.
- (17) Poiriel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011 May;70(1):119-23.
- (18) Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006 April;27(4):351-3.
- (19) Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 2007 December;115(12):1400-8.
- (20) Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control* 2007 December;35(10 Suppl 2):S165-S193.
- (21) Ben-David D, Maor Y, Keller N et al. Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010 June;31(6):620-6.
- (22) Snyder GM, D'Agata EM. Diagnostic accuracy of surveillance cultures to detect gastrointestinal colonization with multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Am J Infect Control* 2012 June;40(5):474-6.
- (23) Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 October;160(4):1212-9.

- (24) DalBen MF, Oliveira MS, Garcia CP et al. Swab cultures across three different body sites among carriers of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* species: a poor surveillance strategy. *J Hosp Infect* 2010 April;74(4):395-6.
- (25) Kropec A, Huebner J, Riffel M et al. Exogenous or endogenous reservoirs of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infections in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Med* 1993;19(3):161-5.
- (26) Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130.
- (27) Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005 June;33(5 Suppl 1):S41-S49.
- (28) Silvia Munoz-Price L, Namias N, Cleary T et al. *Acinetobacter baumannii*: association between environmental contamination of patient rooms and occupant status. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013 May;34(5):517-20.
- (29) Manian FA, Griesenauer S, Senkel D et al. Isolation of *Acinetobacter baumannii* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from hospital rooms following terminal cleaning and disinfection: can we do better? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011 July;32(7):667-72.
- (30) dos Santos Saalfeld SM, Fukita VG, as Siqueira VL, Cardoso CL, Botelho GL, Bronharo Tognim MC. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. *J Hosp Infect* 2009 August;72(4):365-8.
- (31) Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997 June;35(6):1394-7.
- (32) Silva SR, da Rosa NM, Wingeter MA et al. Hand contamination during hospital patient care. *Int J Infect Dis* 2012 August;16(8):e641-e642.

- (33) Winther L, Andersen RM, Baptiste KE, Aalbaek B, Guardabassi L. Association of *Stenotrophomonas maltophilia* infection with lower airway disease in the horse: a retrospective case series. *Vet J* 2010 December;186(3):358-63.
- (34) Judge C, Galvin S, Burke L, Thomas T, Humphreys H, Fitzgerald-Hughes D. Search and you will find: detecting extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from a patient's immediate environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013 May;34(5):534-6.
- (35) Guet-Revillet H, Le MA, Breton N et al. Environmental contamination with extended-spectrum beta-lactamases: is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp? *Am J Infect Control* 2012 November;40(9):845-8.
- (36) Ajao AO, Johnson JK, Harris AD et al. Risk of acquiring extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* from prior room occupants in the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013 May;34(5):453-8.
- (37) Ng KS, Kumarasinghe G, Inglis TJ. Dissemination of respiratory secretions during tracheal tube suctioning in an intensive care unit. *Ann Acad Med Singapore* 1999 March;28(2):178-82.
- (38) Pittet D, Dharan S, Touveneau S, Sauvan V, Perneger TV. Bacterial contamination of the hands of hospital staff during routine patient care. *Arch Intern Med* 1999 April 26;159(8):821-6.
- (39) Doring G, Jansen S, Noll H et al. Distribution and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in a hospital ward. *Pediatr Pulmonol* 1996 February;21(2):90-100.
- (40) O'Grady NP, Alexander M, Burns LA et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* 2011 May;52(9):e162-e193.

(a)



(b)

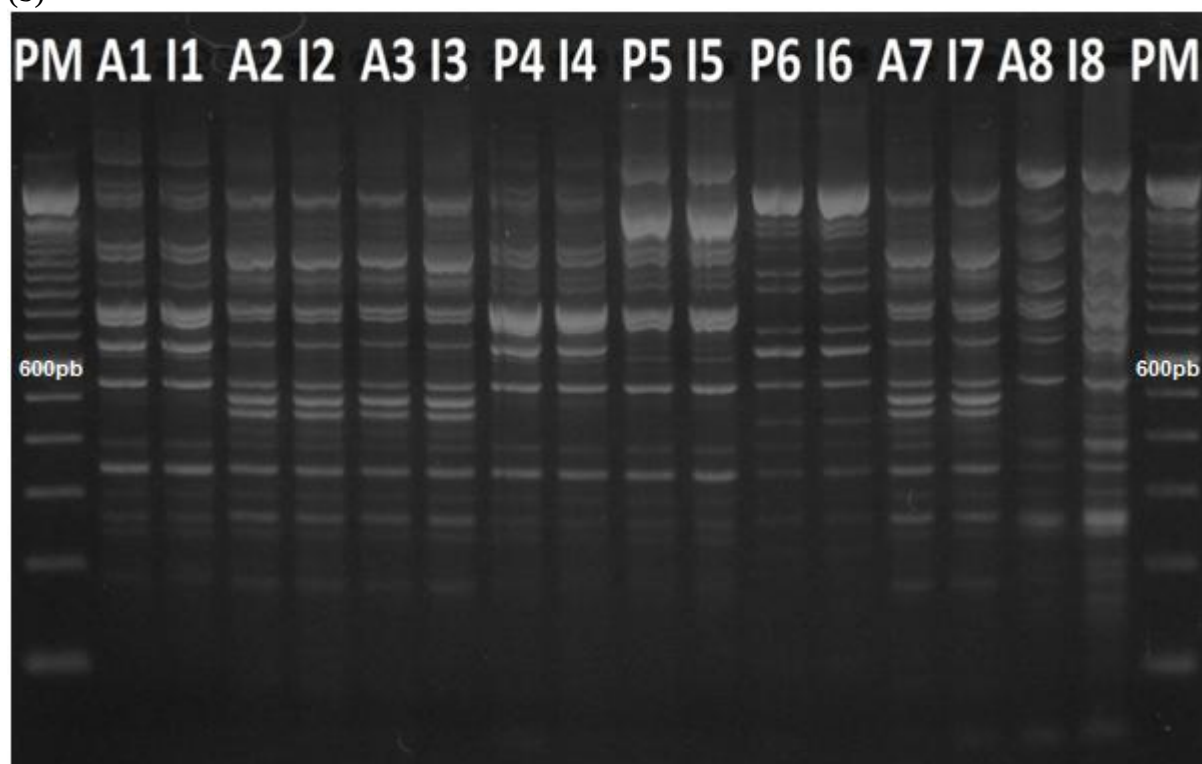


FIGURA 1. Padrão de bandas gerado por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) e *Repetitive Extragenic Palindromic* (REP) - *Polymerase Chain Reaction* (PCR). (a) em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de ERIC-PCR (b) em amostras de *Acinetobacter baumannii* pela técnica de REP-PCR. Amostras de colonização e infecção por paciente. PM= peso molecular de 100 pares de base; A= amostra colonizante anterior à infecção P= amostra colonizante posterior à infecção; I= amostra infectante.

ERIC-PCR

ERIC-PCR

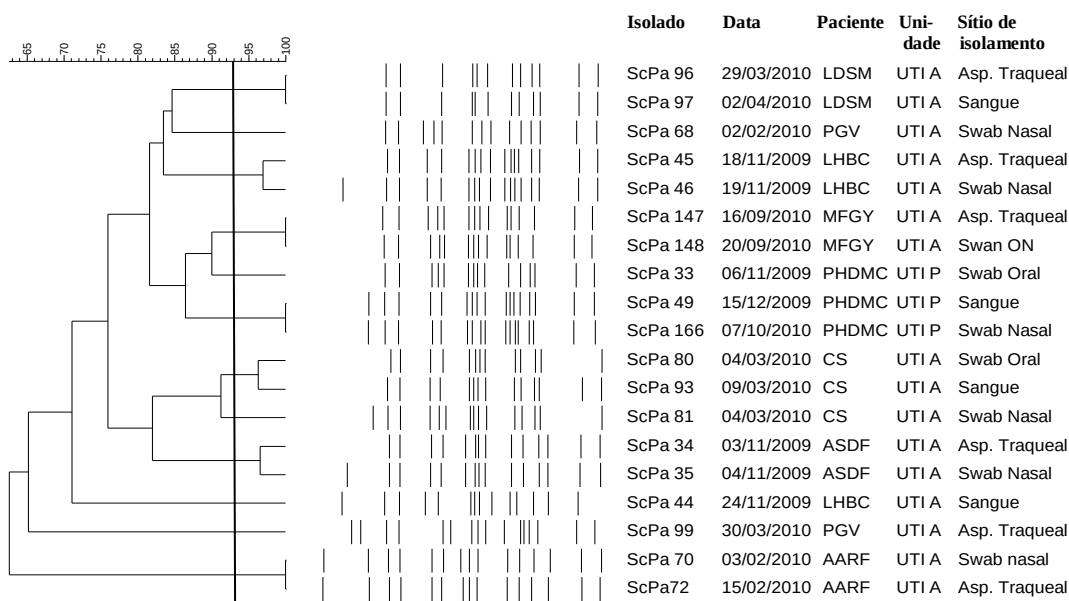


FIGURA 2. Dendrograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Pseudomonas aeruginosa* do Hospital Santa Casa de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidades hospitalares: UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto; UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica.

Sítio de isolamento: Swab ON= Swab Oral e Swab Nasal.

ERIC-PCR

ERIC-PCR

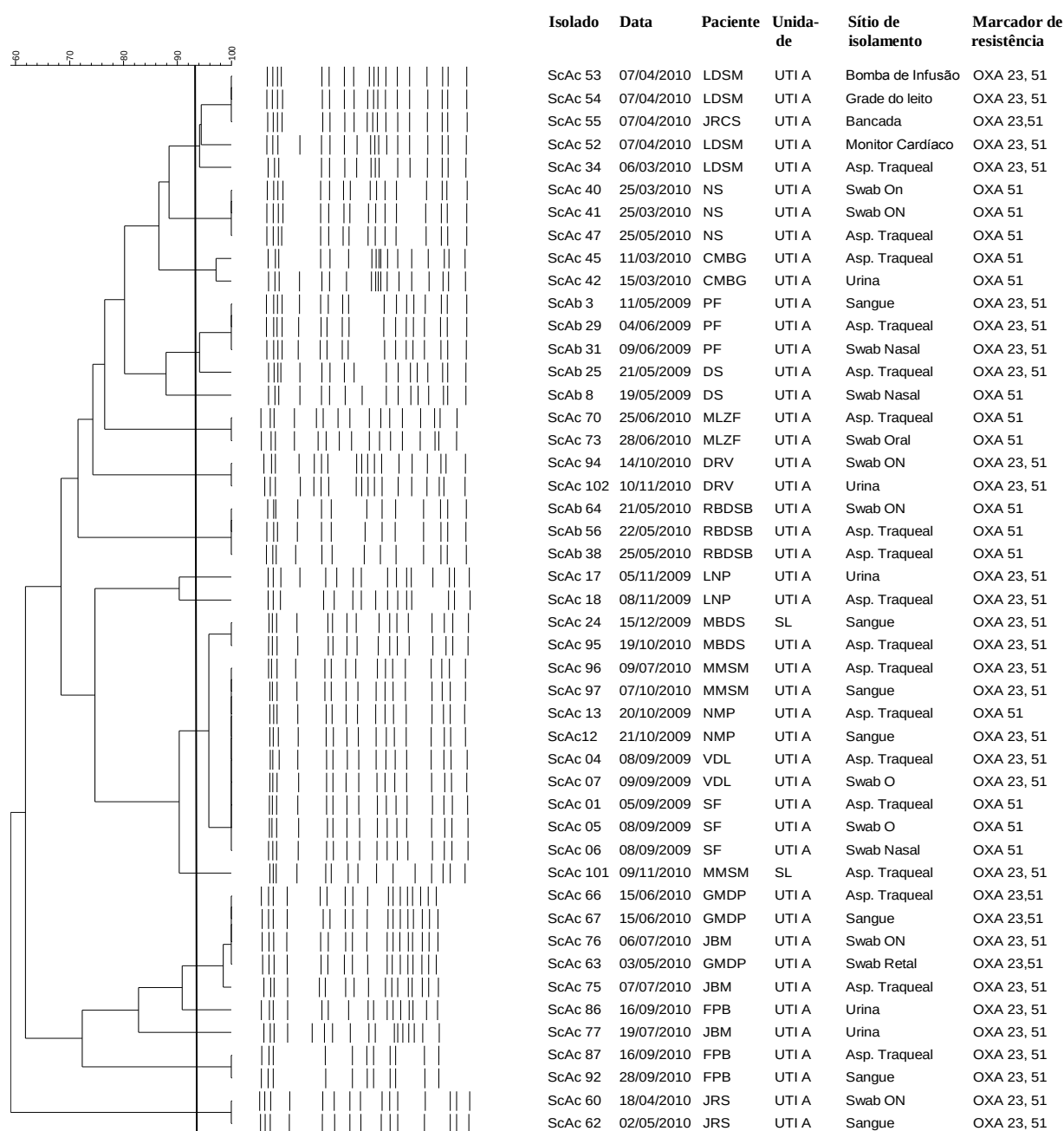


FIGURA 3. Dendograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Acinetobacter baumannii* do Hospital Santa Casa de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidades hospitalares: UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto; SL= São Lucas.

Sítio de isolamento: Swab ON= Swab Oral e Swab Nasal.

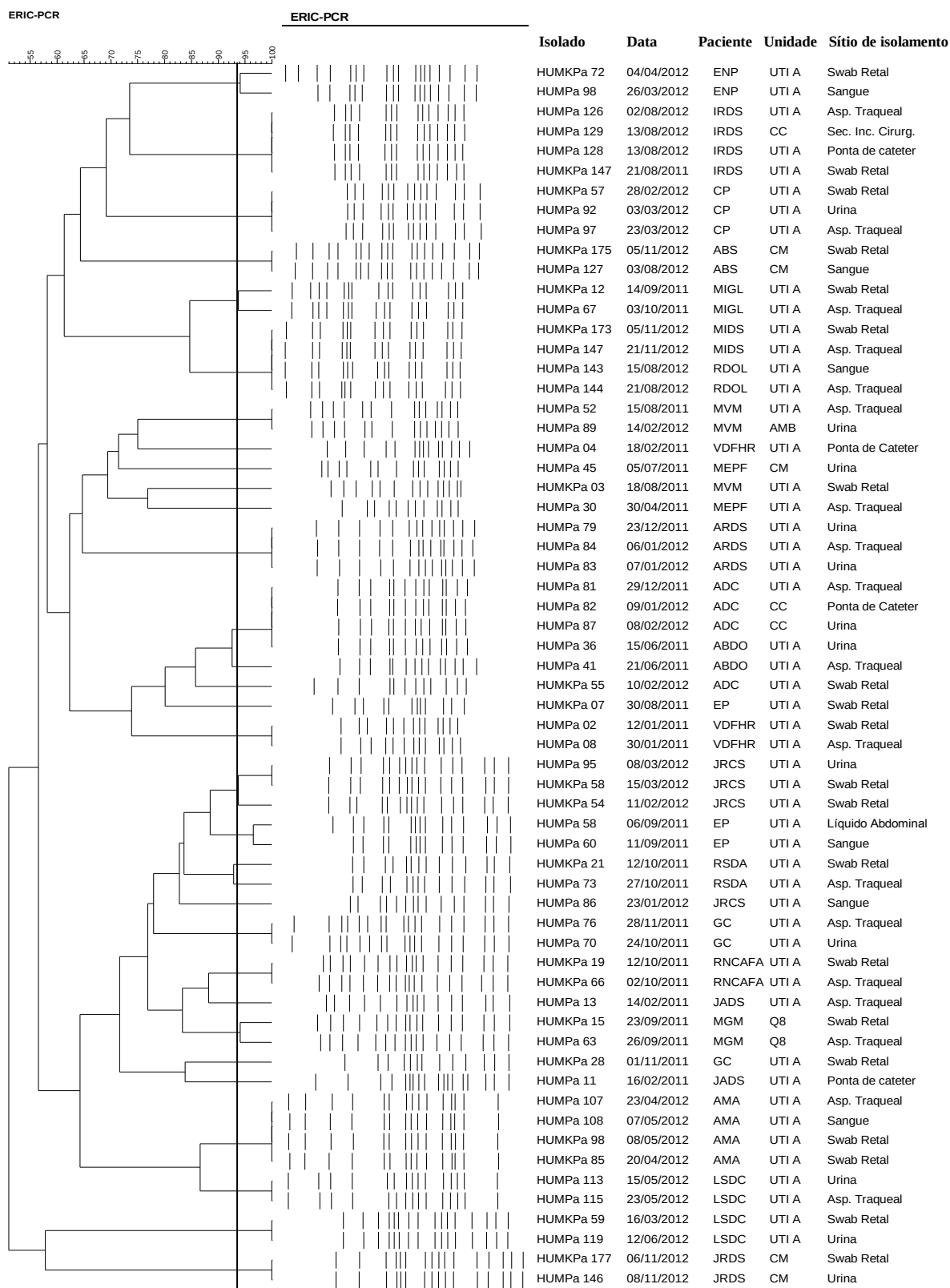


FIGURA 4. Dendrograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Pseudomonas aeruginosa* do Hospital Universitário de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidades hospitalares: UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto; CC= Clínica Cirúrgica; CM= Clínica Médica, AMB= Ambulatório; Q8= Queimados.

ERIC-PCR

ERIC-PCR

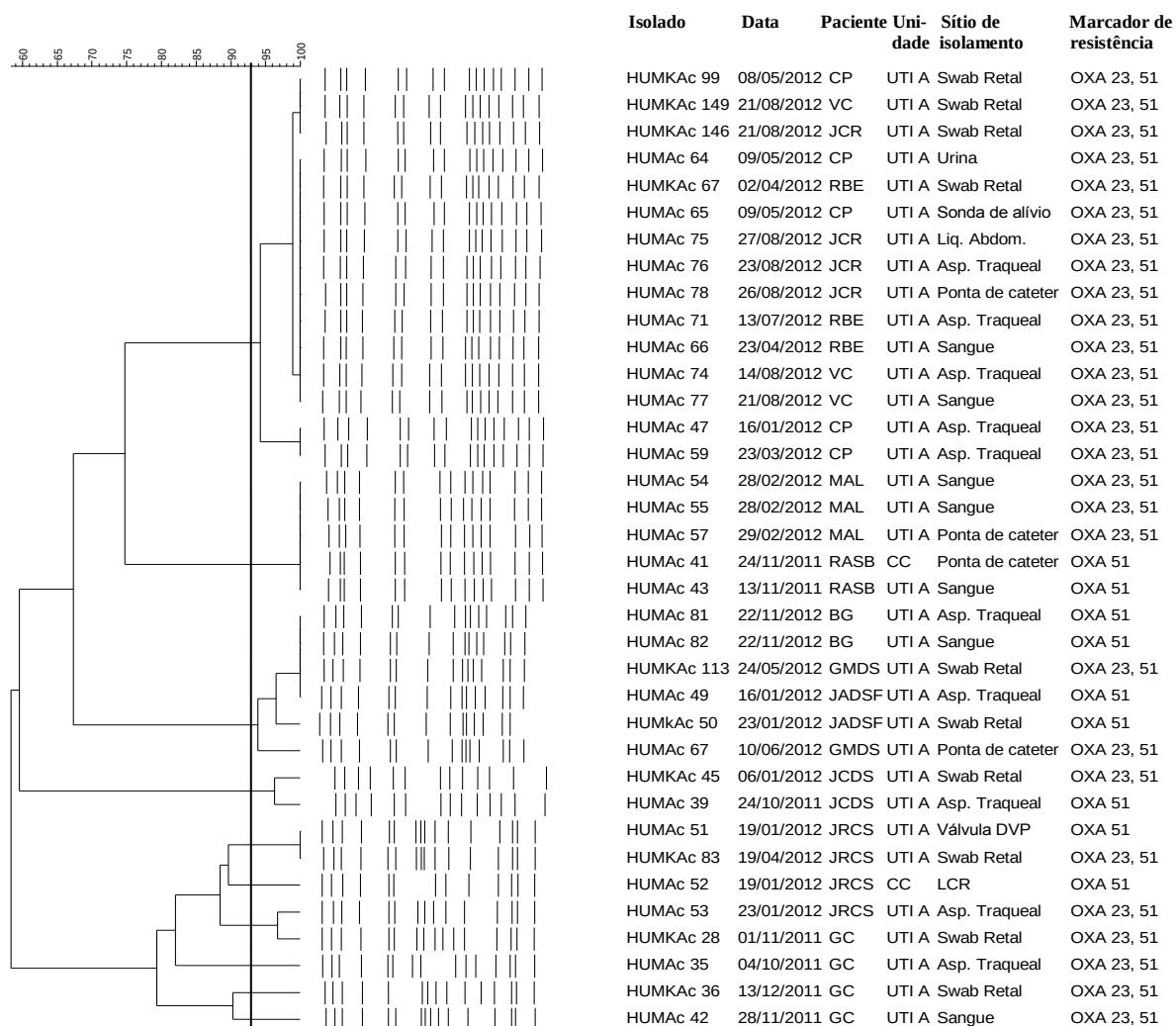


FIGURA 5. Dendograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Acinetobacter baumannii* do Hospital Universitário de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidades hospitalares: UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto; CC= Clínica Cirúrgica.

Sítio de isolamento: LCR= Líquido Cefalorraquidiano; Válvula DVP= Válvula de Derivação Ventrículo Peritoneal.

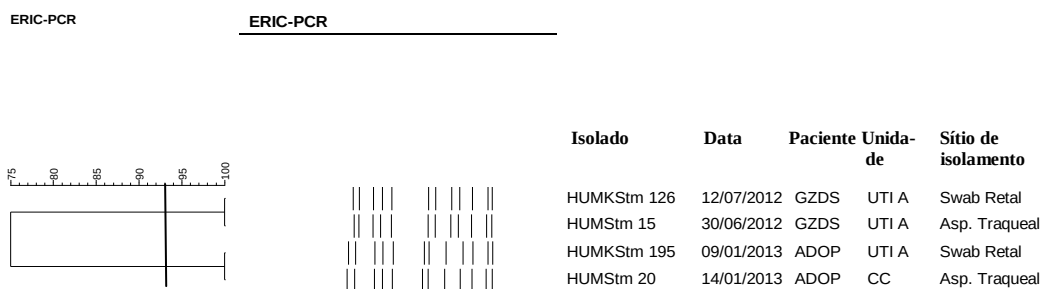


FIGURA 6. Dendograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Stenotrophomonas maltophilia* do Hospital Universitário de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidades hospitalares: UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto; CC= Clínica Cirúrgica.

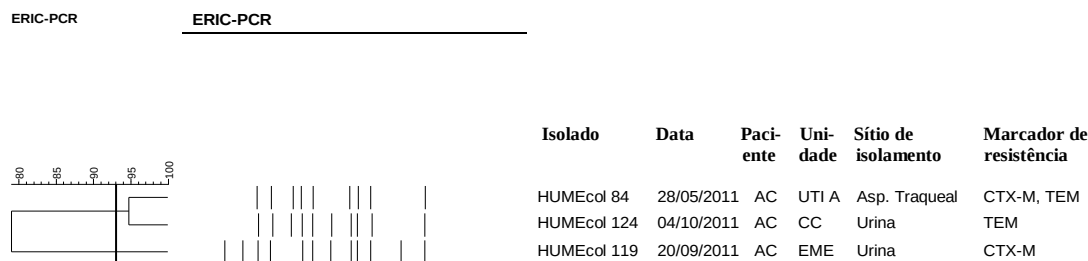


FIGURA 7. Dendograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Escherichia coli* do Hospital Universitário de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidades hospitalares: UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto; CC= Clínica Cirúrgica; EME= Emergência.

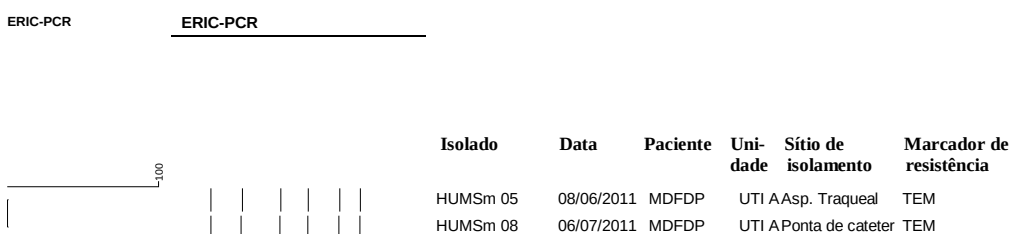


FIGURA 8. Dendograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Serratia marcescens* do Hospital Universitário de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidade hospitalar: UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto.

ERIC-PCR

ERIC-PCR

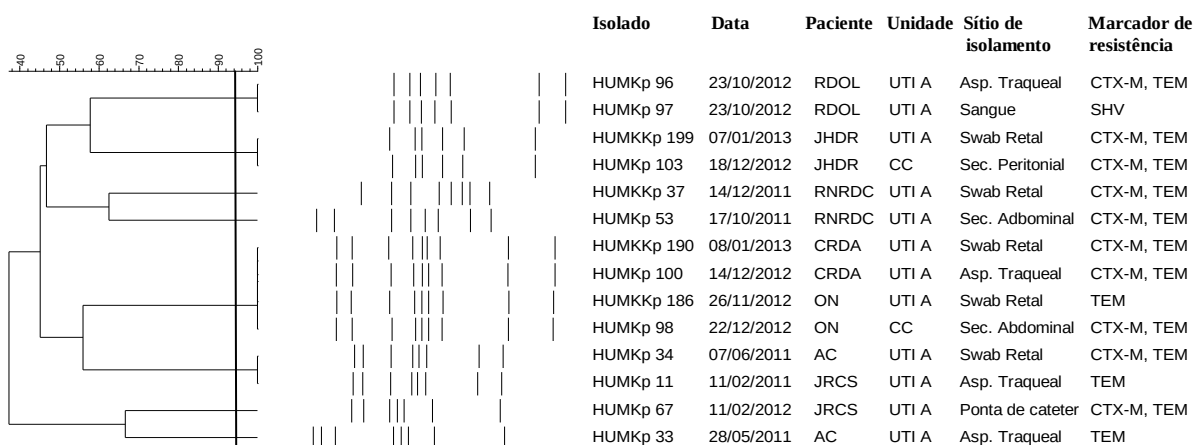


FIGURA 9. Dendograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Klebsiella pneumoniae* do Hospital Universitário de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidades hospitalares: UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto; CC= Clínica Cirúrgica.

ERIC-PCR

ERIC-PCR

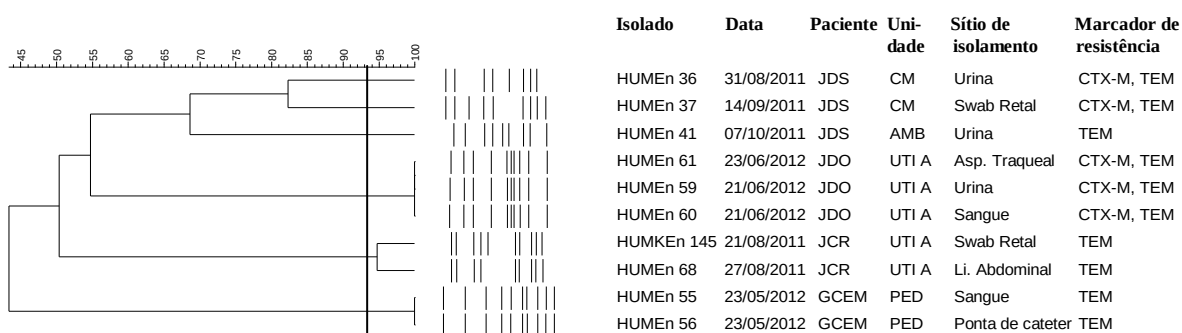


FIGURA 10. Dendograma obtido por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* para amostras de *Enterobacter* spp. do Hospital Universitário de Maringá. Escala representado percentual de similaridade.

Unidades hospitalares: CM= Clínica Médica; AMB= Ambulatório; UTI A= Unidade de Tratamento Intensivo Adulto; PED=Pediatría.

TABELA 1. Percentual de identidade clonal e média de dias entre os isolados clínicos e de colonização.

Bactéria	COLONIZAÇÃO PRÉVIA		COLONIZAÇÃO POSTERIOR	
	Identidade clonal	Média de dias	Identidade clonal	Média de dias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65% (13/20)	16,69 (29,15)	78,57% (11/14)	42,55 (35,5)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	80% (8/10)	15,45 (15,33)	88,89% (8/9)	17,38 (23,22)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100% (1/1)	5 (5)	100% (1/1)	13 (13)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100% (1/1)	34 (34)	50% (2/4)	22,5 (28,3)
<i>Enterobacter</i> spp.	50% (1/2)	6 (14,5)	0 (0/1)	(15)

TABELA 2. Percentual de identidade clonal e média de dias entre os isolados de aspirado traqueal prévio ou posterior a outras amostras clínicas.

Bactéria	ISOLADO TRAQUEAL PRÉVIO		ISOLADO TRAQUEAL POSTERIOR	
	Identidade clonal	Média de dias	Identidade clonal	Média de dias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66,67% (6/9)	12 (35,55)	10% (1/5)	35 (20,6)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	83,33% (10/12)	25,8 (27,08)	33,33% (2/6)	52,5 (34,33)
<i>Escherichia coli</i>	100% (1/1)	130 (130)	0 (0/1)	(112)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100% (1/1)	0 (0)	0 (0/0)	-
<i>Enterobacter</i> spp.	0 (0/0)	-	0 (0/1)	(2)

TABELA 3. Percentagem de não-susceptibilidade dos isolados aos principais antimicrobianos beta-lactâmicos.

Bactéria	Carbapenêmicos	Cefalosporinas de amplo espectro
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Santa Casa	15,79% (3/19)	68,42% (13/19)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HUM	33,87% (21/62)	56,45% (35/62)
<i>Acinetobacter baumannii</i> Santa Casa	63,83% (30/47)	97,87% (46/47)
<i>Acinetobacter baumannii</i> HUM	80,56% (29/36)	100% (36/36)
Enterobactérias	24,14% (7/29)	75,86% (22/29)

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

1. A colonização prévia por bactérias Gram-negativas foi geneticamente relacionada à infecção em 70,6% dos pacientes;
2. Amostras de colonização após o processo infeccioso com identidade genética puderam ser encontradas em 75,9% dos casos;
3. A média de dias entre o isolamento prévio da amostra colonizante idêntica à infectante foi de 16 dias variando de 1 a 88 dias;
4. A média de dias após a infecção da recuperação de amostra colonizantes do mesmo clone das infectantes foi de 30,5 dias variando de 1 a 296 dias;
5. As principais bactérias Gram-negativas envolvidas nos processos de colonização e infecção foram *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*;
6. Enquanto para *P. aeruginosa* a relação clonal foi verificada apenas entre os isolados de colonização e infecção de um mesmo paciente, para *A. baumannii* foi verificada disseminação clonal entre pacientes distintos nos dois hospitais avaliados;
7. Foi verificada a presença de genes e perfis de resistência nas amostras colonizantes idênticos aos das amostras infectantes em longos períodos de colonização;
8. As culturas de vigilância foram essenciais para este estudo da relação entre a colonização e a infecção em bactérias Gram-negativas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Realização da descolonização de pacientes e melhor direcionamento da limpeza e desinfecção do ambiente hospitalar e a avaliação do impacto destas medidas na diminuição das infecções por bacilos Gram-negativos nestes hospitais.

ANEXO

Normas para publicação no periódico: *Infection Control and Hospital Epidemiology*

Instructions for Authors

General Information

Manuscripts submitted to *Infection Control and Hospital Epidemiology (ICHE)* should consist of new material that focuses on healthcare epidemiology or infection control activities. *ICHE* welcomes submissions that address the transmission of pathogens or that involve the use of epidemiological principles and methods to evaluate or improve the delivery of care within healthcare institutions. Examples of appropriate material include studies of infection rates, distributions, or preventive measures; cost-benefit analyses related to infections or other adverse events in patients; surveillance; occupational health issues; pertinent regulatory issues; or analyses of resource use.

Manuscripts should be submitted electronically at the journal's submission website, at <http://iche.edmgr.com>.

Authorship and Disclosures

At the time a manuscript is submitted, all authors are required to disclose all relevant financial support and conflicts of interest in the Acknowledgments section of their manuscript (see the section Manuscript Preparation, below). The Acknowledgments section should be consistent with disclosures that would be stated in the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest.

In addition to stating disclosures in the Acknowledgment section of the manuscript file, all authors of Original Articles, Concise Communications, and Research Briefs are required to complete and upload the ICMJE Disclosure Form when and if they are asked to submit a revision of their manuscript. All authors of Letters and invited manuscripts (Letters in Reply, Commentaries, Reviews, and Guidelines) are required to complete and upload the ICMJE Disclosure Form when they initially submit their manuscript.

If your manuscript is the report of a randomized clinical trial that has been registered in a public trials registry, please provide the trial registry name, the registration identification number, and the URL for the registry at the end of the abstract. This information will be published in the journal if the manuscript is accepted.

Article Types

Original Articles should include a title page, a structured abstract of no more than 250 words (see below), a text of no more than 3,000 words, no more than 7 tables and figures, and no more than 40 references.

Concise Communications should include a title page, a narrative abstract of no more than 50 words, a text of no more than 1,200 words, no more than 2 tables or figures, and no more than 10 references.

Research Briefs should include a title page, a text of no more than 900 words, no more than 1 table or figure, and no more than 10 references. This category of article is intended for the presentation of short, focused, and evidence-based experimental observations: substantial preliminary and novel results of importance to the journal readership but not substantial enough in content to warrant a longer presentation. Research Briefs undergo the same peer review as longer article types.

Letters to the Editor should not exceed 900 words and should include no more than 1 table or figure and no more than 10 references.

Invited Reviews, including guidelines and position papers: committees, task forces, and authors under the auspices of the Society for Healthcare Epidemiology of America, and all others considering the preparation of a review, should contact the editorial office during the very earliest phases of development. The editorial office will verify that there are no similar or overlapping documents under development. Anticipated length, format, number of citations, and mechanisms for peer review and publication by *ICHE* and the involvement of any other organizations will be negotiated with the journal and publisher well in advance of submission.

Commentaries are by invitation only. Please contact the journal office if you are interested in writing a Commentary.

Manuscript Preparation

Authors are encouraged to follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals; this is the format used in PubMed/MEDLINE. They should strive for a concise article that is unencumbered by excessive detail. Authors who are not fluent in English should have their manuscript checked by a native speaker of English and/or an editing service that provides such assistance. Manuscripts that do not follow the required format or are poorly prepared may be rejected for that reason.

Double space the entire manuscript, including title page, abstract, body, references, tables, and figure legends. Use left justification only, so that the right margin is ragged. Number pages consecutively, beginning with the title page. Use a standard font (such as Times New Roman or Helvetica) and set the font size to 12 points (for tables as well as text). Each component of the article should begin on a separate page, as follows: title page, abstract, body text, acknowledgments, references, appendices, figure legends, and tables. All these components must be in a single file, except any figures, each of which should be a separate file (see Figures and Figure Legends, below).

Title Page

The title page should include the following information: (1) the title of the manuscript; (2) the names of the author(s), including each author's highest academic degree or professional certification; (3) the departmental and institutional affiliation of each author, including city, state, and country; (4) the name, address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author responsible for correspondence, and (if different) the name and address to be used for reprint requests; (5) if relevant, a statement about any previous presentation of the data or findings in a preliminary report or abstract; (6) an abbreviated title of not more than 45 characters (including spaces), to be used as a running head in print and for search results online; and (7) a word count for the body of the text (ie, excluding the abstract and the references). Acknowledgment of financial support and potential conflicts of interest must be included and should be placed in the Acknowledgments section (see below).

Abstract

Original Articles should include a structured abstract of no more than 250 words. The following headings are suggested: Objective, Design, Setting, Patients (or Participants), Methods (or Interventions), Results, and Conclusions. If this list of headings is inappropriate, variations are permitted: for example, a study that involved no intervention would use the heading "Methods" rather than "Intervention"; or an analysis of an existing data set might use the heading "Methods" in place of both "Intervention" and "Setting." For brevity, parts of the abstract can be written in phrases rather than complete sentences (eg, "Design: Retrospective cohort study" or "Design: Before-after trial"). The contents of each section should conform to the guidelines below.

Objective. Begin with a clear statement of the precise objective or question addressed in the report. If more than one objective is addressed, indicate the main objective and state only key secondary objectives. If an a priori hypothesis was tested, it should be stated.

Design. Describe the basic design of the study. Include the duration of follow-up, if any. Use as many of the following terms as apply.

- For intervention studies: randomized controlled trial; nonrandomized controlled trial; double-blind; placebo controlled; crossover trial; before-after trial.
- For studies of screening and diagnostic tests: criterion standard (ie, a widely accepted standard with which a new or alternative test is being compared; this term is preferred to "gold standard"); blinded or masked comparison.
- For studies of prognosis: inception cohort (subjects assembled at a similar and early time in the course of the disorder and followed thereafter); cohort (subjects followed forward in time, but not necessarily from a common starting point); validation cohort or validation sample, if the study involves the modeling of clinical predictions.
- For studies of causation: randomized controlled trial; cohort; case-control; survey (preferred to "cross-sectional study").
- For descriptions of the clinical features of medical disorders: survey; case series.
- For studies that include a formal economic evaluation: cost-effectiveness analysis; cost-utility analysis; cost-benefit analysis. For new analyses of existing data sets, the data set should be named and the basic study design disclosed.

Setting. To assist readers in determining the applicability of the report to their own clinical circumstances, include a brief description of the study setting(s). Of particular importance is whether the setting is the general community, a primary care or referral center, a private or institutional practice, or an ambulatory or hospital care setting.

Patients or participants. Provide information on the clinical disorders, important eligibility criteria, and key sociodemographic features of patients and how they were selected, including the number of otherwise eligible subjects who were approached but refused to participate. If matching was used for comparison groups, specify the characteristics that were matched. In follow-up studies, the proportion of participants who completed the study must be indicated. In intervention studies, the number of patients withdrawn because of adverse effects should be given.

For selection procedures, these terms should be used, if appropriate: random sample ("random" refers to a formal, randomized selection in which all eligible subjects have a fixed and usually equal chance of selection); population-based sample; referred sample; consecutive sample; volunteer sample; convenience sample. These terms assist the reader in assessing the generalizability of the study.

Intervention(s). Describe the essential features of any interventions, including the method and duration of administration. The intervention should be named by its most common clinical name (eg, the generic term "oseltamivir"). Common synonyms should be given as well, to facilitate searches online. This includes the brand name of a drug, if a specific product was studied. Also include the name of the manufacturer or supplier for any product(s) mentioned in the manuscript, including software.

Results. Give the main results of the study in narrative form. Define measurements that require explanation for the expected audience of the manuscript. Important measurements not included in the presentation of results should be declared; however, no data should be reported in the abstract that do not appear in the rest of the manuscript. As relevant, indicate whether observers were blinded to patient grouping, particularly for subjective measurements. If possible, the results should be accompanied by confidence intervals (eg, 95%) and the exact level of statistical significance. For comparative studies, confidence intervals should relate to the differences between groups. For nonsignificant differences for the major study outcome measure(s), state the clinically important difference sought, and give the confidence interval for the difference between the groups. When risk changes or effect sizes are given, indicate absolute values, so that the reader can determine the absolute, as well as relative, impact of the finding. Approaches such as "number needed to treat" to achieve a unit of benefit are encouraged when appropriate; reporting of relative differences alone is usually inappropriate. If appropriate, studies of screening and diagnostic tests should use the terms sensitivity, specificity, and likelihood ratio. If predictive values or accuracy are given, prevalence or pretest likelihood should be given as well.

Conclusions. Only those conclusions of the study that are directly supported by the evidence reported should be given, along with the clinical application (avoiding speculation and over-generalization); indicate whether additional study is required before the information should be

used in normal clinical settings. Equal emphasis must be given to positive and negative findings of equal scientific merit.

Clinical trials identifier. If your manuscript is the report of a randomized clinical trial that has been registered in a public trials registry, please provide the trial registry name, the registration identification number, and the URL for the registry at the end of the abstract.

Body Text

The main sections and subdivisions of the body text should be indicated by side heads flush with the left margin and two lines above the text. Keep Methods, Results, and Discussion distinct and separate. The Methods section should provide detail sufficient to allow others to re-create your experiment. Methods may not be described or restated in figure legends or table notes, but must be all together in the Methods section. The Results section contains the previously unpublished data derived by this application of your methods, without commentary (beyond the minimum that might be necessary to ensure intelligibility to the reader). The Discussion section contains your interpretation of the reported data and comments on its meaning. There should be no separate section labeled "Conclusion." Avoid duplicating in the text data that have been provided in tables or figures (minimal duplication, for emphasis or clarity, is acceptable). Also avoid duplication within the text; for example, the Discussion section should not restate all the findings that have been presented in Results and/or in tables and figures.

The Editor requests that authors reporting the results of clinical trials describe clearly the following: (1) eligibility criteria; (2) whether subjects were admitted before allocation to one of the study groups; (3) the method of randomization; (4) whether the study was "masked," what specific information was masked, and whether subjects, clinicians, and evaluators were masked; (5) the method used to identify treatment complications; (6) an explanation and analysis of subjects lost to follow-up; (7) statistical methods used; and (8) information that led to the determination of the size of the study groups and the expected differences between groups. For all studies involving human subjects, the Methods section should include a statement that the study was reviewed and approved by the authors' institutional review board.

Abbreviations should conform to those given in the *AMA Manual of Style*. Symbols for units of measurement (mm, mL) should not be followed by periods. Chemical or generic names of drugs, materials, and equipment are strongly preferred; a proprietary name may be given only after it is preceded by the generic or chemical name the first time it appears and must be followed by the name of the manufacturer or supplier. Terms and abbreviations must be defined at first use, separately for the abstract, the body, and each table and figure. Use only common abbreviations and use as few as possible; and do not abbreviate terms used fewer than 5 times. Abbreviate genus names after first mention.

Footnotes are acceptable in tables but cannot be used in the body of the manuscript; any footnotes in your manuscript will be integrated into the text, perhaps in parentheses.

Acknowledgments

Financial support. The Acknowledgments section should list all sources of financial support for the work, including any financial arrangement with a company whose product is related to the study. If there was no financial support, that too should be stated. The statement should be consistent with disclosures that would be stated in the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest.

Examples:

- *Financial support.* The GERES Project is supported by the French Ministry of Health. Additional support for this study was provided by Becton-Dickinson and SIMS France.
- *Financial support.* H.S.C. received grant support from the Department of Veterans Affairs Rehabilitation Research and Development Service Merit Review (C2234-MD and C3-2442MD), D.B.L. received support from the US Public Health Service (grant HC41024), and A.E.T. received salary support from an Emerging Infectious Diseases Cooperative Agreement. C.U. receives 2% salary support from Aventis Pasteur for work on another study.
- *Financial support.* None reported.

Conflict of interest. The Acknowledgments section must contain a statement of potential conflicts of interest. If the manuscript is accepted for publication, the disclosures will be published. The Acknowledgments section of the manuscript must list the name of each contributing author and any potential conflicts of interest for each author for the previous three years; if no potential conflict exists, that too should be stated. The statement should be consistent with disclosures that would be stated in the ICMJE Disclosure Form. There is a potential conflict of interest when anyone involved in the publication process has a financial or other beneficial interest in the products or concepts mentioned in a submitted manuscript, or in competing products, that might bias his or her judgment. Examples of potential conflicts of interest with respect to a company whose product is mentioned in the manuscript include owning stock (except as part of a diversified portfolio), receiving grants, serving as a consultant, or being on the speakers' bureau. (This information is exclusive of the financial support discussed above.)

Examples:

- *Potential conflicts of interest.* S.A. and K.H. report that they are shareholders in Loke Diagnostics (Aarhus, Denmark).
- *Potential conflicts of interest.* K.L.H. reports having consulted for and having received grant support from Astellas and reports having received an honorarium from Cubist before starting employment with the New York Department of Public Health in 2009.
- *Potential conflicts of interest.* E.F.M. reports that she has been a consultant to Merck, Novartis, and GlaxoSmithKline and is member of the speakers' bureaus for Ortho McNeil and Novartis. J.A.S. reports that he received research funding from Bayer and Ortho McNeil and

that he has been a consultant for Bayer and Pfizer. J.D.C. reports that he is an employee of AB Biodisk.

- *Potential conflicts of interest.* All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Authorship and manuscript preparation. If the manufacturer of a product discussed in a submitted manuscript had a role, either directly or through a third party, in the gathering or preparation of data or in the writing of the manuscript, that information must be disclosed in the Acknowledgments section. If anyone other than the named authors had a role in the gathering or preparation of data or in the writing of the manuscript, that too should be disclosed.

Examples:

- *Manuscript preparation.* Steris Corporation provided assistance with study design and data acquisition.
- *Manuscript preparation.* Statistical and other analyses were done by 3M Medical Division.
- *Manuscript preparation.* MedCommunications (Philadelphia) provided assistance in preparing and editing the manuscript.

Disclosure documentation. All authors of Original Articles, Concise Communications, and Research Briefs are required to complete and upload the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest when and if they are asked to submit a revision of their manuscript. All authors of Letters and invited manuscripts (Letters in Reply, Commentaries, Reviews, and Guidelines) are required to complete and upload the ICMJE Disclosure Form when they initially submit their manuscript. (See the section Authorship and Disclosures, above.) Note that this documentation is in addition to the disclosure statements in the Acknowledgments section of the manuscript file.

Thank yous. Persons should not be thanked in the Acknowledgments section without their knowledge and consent. Authors will be asked during the submission process to confirm they obtained permission from all persons thanked by name in the Acknowledgments section.

References

References should be cited consecutively in the text, with superscript numbers placed outside periods and commas and inside colons and semicolons. References cited only in tables or figure legends should be numbered as though all were cited at the point at which the table or figure was first mentioned.

A paper that is "in press" may be included in the reference list if it has been accepted for publication. Citations such as "in preparation," "submitted for publication," "unpublished data," and "personal communication" should be given in parentheses in the text only, including the names of all individuals to whom the information should be attributed, as well as each person's highest academic degree and the month and year of the information's origin. For personal communications, specify whether the communication was written or oral.

At the end of each manuscript, list the references in numerical order, double spaced, according to the order they are cited in the text. If there are 7 or more authors, list the first 3 authors' names, followed by "et al"; otherwise, list all authors. Abbreviations of journal names should conform to *Index Medicus* or MEDLINE. Unlisted journals should not be abbreviated. Authors are responsible for bibliographic accuracy. Journal titles should be cited as they existed at the time of publication. Format references according to the style given in the AMA Manual of Style, 10th Edition.

Journal article (examples)

1. Pittet D, Simon A, Hugonnet S, Pessoa-Silva CL, Sauvan V, Perneger TV. Hand hygiene among physicians: performance, beliefs, and perceptions. *Ann Intern Med* 2004;141:1-8.
2. Camins BC, Richmond AM, Dyer KL, et al. A crossover intervention trial evaluating the efficacy of a chlorhexidine-impregnated sponge in reducing catheter-related bloodstream infections among patients undergoing hemodialysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:1118-1123.

Journal article in press (example)

3. Figueroa P, Johanssen KL, Price FG, et al. Outbreak of *Acinetobacter* infection in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* (in press).

Paper presented at a professional meeting (example)

4. Chen LF, Freeman JT, Sexton DJ, Choi YI, Anderson DJ. NHSN definition of laboratory-detected BSI is overly sensitive for *Enterococcus*. In: Program and abstracts of the 19th Annual Scientific Meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA); March 18–22, 2009; San Diego, CA. Abstract 359.

Book (example)

5. Heoprich PD. *Infectious Diseases*. 2nd ed. New York, NY: Harper & Row; 1977.

Chapter in a book (example)

6. Schaffner W. Psittacosis: ornithosis, parrot fever. In: Beeson PB, McDermott W, Wyngaarden JB, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 15th ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders; 1979:336-338.

Web page (example)

7. Clinical laboratory fee schedule. Centers for Medicare and Medicaid Services website. http://www.cms.gov/ClinicalLabFeeSched/02_clinlab.asp#TopOfPage. Published 2010. Accessed April 2, 2010.

Tables

Prepare tables with the MS Word table editor; text formatted to look like a table by use of tabs and hard returns is not acceptable and will be rejected. Include tables in the same file as the rest of the manuscript, not in separate files. Tables should be double spaced. Number tables in the order in which they are cited in the text, and provide a descriptive title for each table.

Every column in a table requires a head that describes the contents of the cells below. The units of measure for all data must be clearly stated in the heads, in the stub (leftmost) column, or in data cells, as appropriate. Do not use vertical lines, and do not use ditto marks for repeated information.

List and define any abbreviations in a note below the table, above the table footnotes (no footnote designator is required for this line), even if the abbreviations have been defined in the text. Use superscript letters for footnote designators.

Tables that are too large to be reproduced in print, if accepted for publication, will appear only in the online version of the article, and information about the online-only table (including a full or partial title) will be included in the print version of the article.

Figures and Figure Legends

Figures. Number figures in the order in which they are mentioned in the text, and provide a brief but descriptive caption (legend) for each figure. The journal does not print color figures. Color figures that can be usefully published in black and white will be published that way in print, and color versions will appear in the online journal if necessary. Figures that are useful only in color will be available only in the online version of the article, and information about the online-only figure (including a full or partial legend) will be included in the print version of the article.

All artwork (figures, photographs, and illustrations) should be submitted as digital files. The required format is TIFF or EPS, with the following resolutions: 1,200 dpi for line figures (eg, graphs), 600 dpi for grayscale figures (eg, photographs), and 300 dpi for color figures. PowerPoint, Word, and JPEG files will not be accepted. Each figure or illustration must be a stand-alone file, separate from the text file, and named to match the number cited in the text (eg, fig1.eps). Do not include titles and legends in illustration files.

Figure legends should be double spaced on a separate page of the manuscript. (This is because a figure is reproduced as an image file, whereas the legend that accompanies the

figure is typeset as text.) Place figure titles and explanations in the legend, not on the figure image. On the other hand, graphic elements that require definition, such as symbols, are best placed and defined in available open space within the figure itself.

The text of the figure legend should concisely and accurately label what the figure depicts and define any abbreviations or terms used within it. The figure legend should not describe or restate methods, nor state or restate detailed findings, nor state a claim or conclusion drawn from the data displayed. Such statements belong in the appropriate section of the body text, not in a figure legend.

Online-Only Material

All material that can be typeset is included in the print edition of the journal. Online-only publication is reserved for material that is too difficult or impossible to present in the print edition, eg., color versions of black and white figures, videos, and Excel files containing interactive elements. Designation of content as “online-only” should not be used to shorten the anticipated print version of a submission.

Supporting Documents

Include a cover letter with your submission; the cover letter should state that all authors have read and approved the submission of the manuscript. The letter also should state that the manuscript has not been published elsewhere and that it is not currently under consideration for publication by another journal. Include the names and contact information for any individuals who are especially qualified to review the manuscript; you may also name any individuals who may not be able to provide an unbiased review.

Any closely related manuscripts that have not yet been published should be included with the manuscript being submitted; *ICHE* does not publish articles that overlap substantially with work published or in press elsewhere.

Review and Publication Process

Each manuscript is evaluated by two editors; most are sent to two outside reviewers. Authors are notified as soon as possible regarding the acceptability of their manuscripts. Note that acceptability may sometimes hinge on whether the manuscript can be appropriately revised or shortened substantially before publication.

Authors of accepted manuscripts are asked to sign a publication agreement, transferring copyright to the Society for Healthcare Epidemiology of America. Material published in the journal may not be reproduced or published elsewhere without written consent of the Society and the publisher. Direct requests about licensing and permissions to the University of Chicago Press via [the *ICHE* website](#) or by fax (773-834-3489). Note that an article is in the public domain only if *all* authors are employees of the US government.

Every manuscript that is accepted for publication is edited according to the journal's style and format requirements before it is published online and in print. After the manuscript has been edited and typeset, the author responsible for correspondence will receive an e-mail message from the University of Chicago Press production staff, containing instructions for obtaining page proofs in PDF form from a secure Web site. Authors are asked to respond to all queries from the Press's manuscript editors and to provide any additional corrections within 48 hours after the proof notification. Once page proofs are sent, authors will be able to order reprints via the Internet <http://www.sheridan.com/UChicagoPress/eoc>.

(Updated December 5, 2012)

