

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Mariana Bruno Rodrigues Benitez

CONTAMINANTES MICROBIANOS EM NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL

Rio de Janeiro

2018

Mariana Bruno Rodrigues Benitez

CONTAMINANTES MICROBIANOS EM NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Dra. Célia M. C. P. A. Romão
Dra. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Benitez, Mariana

Contaminantes microbianos em nutrição parenteral total. / Mariana Benitez. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

138 f. : il. ; fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadoras: Célia Romão. Verônica Vieira

1. Nutrição parenteral. 2. Vigilância Sanitária. 3. Controle de Qualidade. 4. Contaminação. 5. Taxonomia Bacteriana. I. Título.

Microbial contaminants in total parenteral nutrition.

Mariana Bruno Rodrigues Benitez

CONTAMINANTES MICROBIANOS EM NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Felipe Piedade Gonçalves Neves (Doutor)
Universidade Federal Fluminense

Cátia Aparecida Miranda Chaia (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Verônica Viana Vieira (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico esse trabalho a Jesus, o Senhor da minha vida, à minha filha, Maria Alice, ao meu marido Joel e aos meus pais, Marcia e Marcel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelo o início e pela a conclusão desse trabalho, pois sem Ele não seriam possíveis, me sustentando nos momentos difíceis. Não tenho dúvidas de que Ele me carregou no colo.

À minha filha Maria Alice, pois o seu sorriso no final do dia era o meu calmante, minha alegria, minha motivação diária para a conclusão desse trabalho. Ao olhar para você, eu não tinha dúvidas de que tudo daria certo no final. O melhor título que ganhei foi o de “Mãe”!

Ao meu melhor amigo, parceiro e marido, Joel, que me deu força para iniciar o mestrado e sempre me incentiva a crescer profissionalmente. Você foi essencial, sendo a minha calma e meu porto seguro nos dias de tempestades.

Aos meus pais, Marcia e Marcel, por uma vida de dedicação à minha criação, por serem a minha base, me ensinando os valores corretos e a importância dos estudos. Pelo carinho e amor.

Aos meus sogros Jane e Joel, por todo carinho e auxílio nos momentos que precisei durante essa caminhada.

À toda minha família... irmão Marcel, bisavó Ersília, avó Marly, madrinha Ana, tias Viviane, Silvana e Celmar, primas Amanda, Anna Júlia, Anne, Carol, Giovanna e Marina, sobrinho João Pedro, cunhadas Suellen e Carol e amiga-irmã Daiane... que nos momentos juntos sempre trazem ainda mais alegria para a minha vida, que sempre vibram junto comigo pelas minhas conquistas.

À minha orientadora Dra. Célia Romão, que no momento em que desejei iniciar o mestrado, era minha chefe e me deu todo o suporte para iniciá-lo. Agradeço também por toda disponibilidade, tempo dedicado e ensinamentos.

À minha orientadora Dra. Verônica Vieira, que abraçou o meu mestrado com muito carinho, me apresentando a biologia molecular e a taxonomia bacteriana. Obrigada pelo suporte laboratorial, conhecimento transmitido a mim e tempo dedicado.

À Erica Miranda, por tudo que me ensinou sobre prática de biologia molecular, pelo suporte técnico nos experimentos, pela amizade, pelas infinitas risadas, por todo carinho. Você foi fundamental! Você é um presente que o mestrado me deu!

Às minhas amigas e companheiras de departamento: Ana Paula Pereira, Carolina dos Santos, Claudia Souto, Marília Martins, Monica Almeida e Renata Trotta, por estarem sempre dispostas a ouvir meus desabafos, por torcerem por mim durante essa trajetória, pelos almoços e por tornarem a rotina diária mais leve. Como é bom ter vocês na minha vida!

À Dra. Ana Paula Pereira, responsável pelo Setor de Produtos Estéreis, pelo apoio e contribuição no início e no decorrer desse trabalho.

À equipe do Setor de Fungos do INCQS: Carolina dos Santos, Carlos Sobrinho, Claudia Souto, Gabriela Rezende, Marília Martins e Miguel Fialho, pela compreensão nos momentos em que me ausentei devido ao mestrado, pelas risadas e por sempre torcerem pelo sucesso dos meus experimentos.

À Dra. Catia Chaia, por todo apoio e ensinamento, desde o momento em que ficou sabendo que eu iria tentar passar para o mestrado.

Ao Paulo Baio pelos ensinamentos e auxílio na análise de dados de sequenciamento.

Ao Dr. Carlos Sobrinho, meu atual chefe de setor e ex-chefe de Departamento de Microbiologia, que me deu todo apoio no decorrer do mestrado, inclusive durante a troca de setor de trabalho.

À Dra. Suely Fracalanza, que era a chefe do Departamento de Microbiologia em 2016, por autorizar o início do meu mestrado.

Ao Setor de Bactérias e Arqueas por ceder cepas, em especial, ao João Veras, que teve muita boa vontade e se disponibilizou a procurá-los.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia, em especial à Talita Coelho e Rafael Lawson, pelas dicas quando algum experimento não dava certo, e à Claudia Andrade, pela liofilização das cepas.

À equipe do laboratório do CBAS do IOC, em especial à Talita, que tornou os dias de experimento mais leves e animados, além de toda ajuda prestada.

À Luciana Veloso por disponibilizar a análise de espectrofotometria de massa em Bio-manguinhos.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pelo convívio durante as aulas e troca de conhecimento, especialmente à Luciana Veloso e Camila Lins, que acompanharam de perto várias etapas do meu mestrado. Sempre estavam na torcida para que tudo desse certo!

Às minhas amigas através da Creche Fiocruz (Alessandra, Anna, Gleisse, Rowena, Vanessa), pelos momentos de desabafo, risadas e torcida.

À Creche Fiocruz e professoras, em especial à Angélica, Christiane, Daniele, Graziela, Isabela, Lilian, Paula e Sandra Maria, por sempre cuidarem com carinho da Maria Alice para que eu pudesse realizar minhas atividades tranquila.

Aos profissionais do Setor de Meio de Cultura (Catia, Jorge, Marcos, Monica, Pedro Paulo e Will), pelo apoio no início do meu mestrado e por tudo que tive a oportunidade de aprender durante os seis anos em que trabalhei com vocês.

Aos profissionais do Setor de Esterilização (Edmilson, Renata, Rene e Sineide), pelo fornecimento de vidrarias e materiais estéreis.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação do INCQS pelas aulas maravilhosas ministradas, ensinamentos passados e dicas para elaboração da dissertação, em especial, Dra. Catia Chaia, Dr. Marcelo Brandão, Dra. Kátia Leandro e Dra. Karla Meneses.

À Dra. Maria Helena Villas Boas, pela disponibilidade e revisão desta dissertação.

Aos professores da banca por terem aceitado convite.

À coordenação e equipe do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

À Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária, Setor de Biologia Molecular do INCQS, Coleção de Bactérias em Ambiente e Saúde (CBAS-IOC) e Bio-Manguinhos pelo suporte laboratorial.

À Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz e sua equipe, por toda gentileza e empenho em suas atividades.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pela oportunidade.

À Fiocruz, essa instituição que sempre foi referência na minha vida, local que sempre admirei e sonhei trabalhar, por permitir a realização do mestrado junto com a minha rotina de trabalho.

EPÍGRAFE

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A nutrição parenteral (NP) possui grande importância clínica no tratamento e prevenção da desnutrição, que é uma causa relacionada à morbidade e à mortalidade de pacientes imunocomprometidos. As formulações de NP são elaboradas para fornecer nutrientes em doses suficientes para a necessidade diária do paciente, sendo uma mistura complexa com diversos componentes. Apesar das boas práticas de manipulação de NP estarem bem estabelecidas, a contaminação desses produtos ainda ocorre. O presente estudo teve por objetivo realizar a identificação fenotípica (provas bioquímicas convencionais e MALDI-TOF MS) e genotípica (sequenciamento dos genes *rrs*, *atpD*, *gyrB*, *infB* e *rpoB*, realizando-se MLSA) das cepas provenientes de NPs contaminadas, recebidas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016. Além disso, obter um panorama sobre as características das amostras encaminhadas ao INCQS com base na análise de processos documentais, através de levantamento no sistema de gerenciamento de amostras. Foram encaminhadas ao INCQS 134 amostras de NP, oriundas de demanda espontânea, sendo 61% como modalidade fiscal e 39% como orientação. Todas as NPs foram coletadas como amostras únicas. Os motivos de apreensão foram problemas de contaminação microbiana (89%) e problemas metabólicos (11%). As amostras foram apreendidas nas regiões Sul (72%) e Sudeste (28%). Das 113 amostras que foram submetidas ao ensaio de esterilidade, aproximadamente 87% (98 amostras) estavam satisfatórias e 13% (15 amostras) insatisfatórias. O tempo entre a coleta e a entrada da amostra de NP no INCQS variou de 0 a 8 dias, sendo predominante o tempo de dois dias (60%). Seis amostras foram canceladas (4,5%). O volume da amostra variou de 3 mL a 250 mL. A distribuição por ano foi: 11,20% das amostras foram encaminhadas em 2001, 0,80% em 2005, 8,20% em 2006, 16,40% em 2007, 63,40% em 2013. No período de estudo, quatro surtos ocorridos devido à contaminação foram relatados. Foram obtidas 26 cepas provenientes de NPs contaminadas. As cepas foram identificadas como pertencentes aos complexos *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter cloacae*, e à espécie *Rhizobium radiobacter* pelas provas bioquímicas convencionais. Todos foram identificados como pertencentes à família Enterobacteriaceae e *R. radiobacter* pelo MALDI-TOF MS, já pelo sequenciamento do gene *rrs* foram identificados como *Phytobacter diazotrophicus*, *Kosakonia* spp. e *Agrobacterium pusense*, respectivamente. O método de MLSA confirmou a identificação de *P. diazotrophicus* e *Kosakonia* spp. A caracterização fenotípica não foi suficiente para identificar gênero e espécie. O sequenciamento do gene *rrs* se mostrou eficiente para identificação de *P.*

diazotrophicus, porém, não foi eficaz para as duas cepas do gênero *Kosakonia*. O MLSA resultou em uma árvore filogenética com boa resolução, permitindo a identificação das cepas e verificação de uma possível nova espécie de *Kosakonia*. A melhoria de protocolos de identificação de bactérias de origem ambiental é necessária, visto que as mesmas podem acometer pacientes através de fluidos intravenosos, incluindo NP. Como as amostras de NP são encaminhadas ao INCQS apenas de acordo com uma demanda espontânea, não ocorre homogeneidade na análise entre os diferentes estados e regiões. Ações de vigilância sanitária (VISA) são necessárias para melhor controle e atenção às NPs produzidas no Brasil.

Palavras-chave: Nutrição Parenteral. Vigilância Sanitária. Controle de Qualidade. Contaminação. Taxonomia Bacteriana.

ABSTRACT

Parenteral nutrition (NP) has great clinical relevance in the treatment and prevention of malnutrition, which is a cause related to the morbidity and mortality of immunocompromised patients. NP formulations are designed to provide nutrients in sufficient doses for the patient's daily need, being a complex mixture with several components. Although good NP handling practices are well established, contamination of these products still occurs. The present study aimed to perform the phenotypic (conventional biochemical tests and MALDI-TOF MS) and genotypic (*rrs*, *atpD*, *gyrB*, *infB* and *rpoB*, and MLSA) identification of bacterial isolates from contaminated NPs, received in National Institute of Health Quality Control (INCQS) from January 2000 to December 2016. In addition, to obtain an overview of the samples characteristics sent to the Institute based on the analysis of documentary processes, through a survey in the sample management system. One hundred and thirty-four samples of NP were sent to the INCQS, resulting from spontaneous demand, 61% as fiscal modality and 39% as orientation analysis. All NPs were collected as unique samples. The reasons for seizure were problems of microbial contamination (89%) and metabolic problems (11%). Samples were collected in the South (72%) and Southeast (28%) regions. Of the 113 samples that were submitted to the sterility test, approximately 87% (98 samples) were satisfactory and 13% (15 samples) were disapproved. The time between collection and NP sample entry in INCQS ranged from 0 to 8 days, with two days (60%) being the predominant time. Six samples were canceled (4.5%). The sample volume ranged from 3 mL to 250 mL. The distribution per year was: 11.20% of the samples were forwarded in 2001, 0.80% in 2005, 8.20% in 2006, 16.40% in 2007, 63.40% in 2013. In the study period, four outbreaks due to contamination were reported. Twenty-six isolates from contaminated NPs were obtained. The isolates were identified as belonging to *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter cloacae* complexes and to the *Rhizobium radiobacter* species by conventional biochemical tests. All were identified as belonging to the family Enterobacteriaceae and *R. radiobacter* by MALDI-TOF MS, and by sequencing the *rrs* gene were identified as *Phytobacter diazotrophicus*, *Kosakonia* spp. and *Agrobacterium pusense*, respectively. The MLSA method confirmed the identification of *P. diazotrophicus* and *Kosakonia* spp. The phenotypic characterization was not sufficient to identify genus and species. Sequencing of the *rrs* gene was efficient for identification of *P. diazotrophicus*, but was not effective for the two isolates of the *Kosakonia* genus. The MLSA resulted in a phylogenetic tree with good resolution, allowing the identification of the isolates and screening of a possible new species of *Kosakonia*. Improved

protocols for environmental bacteria identification are necessary since these bacteria can reach patients through intravenous fluids, including parenteral nutrition. As NP samples are sent to the INCQS only according to a spontaneous demand, there is no homogeneity in the analysis between the different states and regions. VISA actions are necessary for better control and attention to NPs produced in Brazil.

Key-words: Parenteral Nutrition. Health Surveillance. Quality control. Contamination. Bacterial Taxonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Etapas da Terapia de Nutrição Parenteral.....	28
Quadro 2 – Casos de infecção relacionados à contaminação de NP.....	35
Quadro 3 – Resistência intrínseca aos antimicrobianos apresentada por micro-organismos pertencentes à família Enterobacteriaceae.....	52
Quadro 4 – Cepas provenientes de NP estudados.....	57
Quadro 5 – Iniciadores utilizados na amplificação dos genes <i>rrs</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>atpD</i> , <i>infB</i>	62
Quadro 6 – Condições da reação de PCR utilizada para amplificação dos genes <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>atpD</i> , <i>infB</i>	63
Quadro 7 – Iniciadores utilizados no sequenciamento dos genes <i>rrs</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>atpD</i> , <i>infB</i>	64
Quadro 8 – Leitura do equipamento VITEK®2 <i>Compact</i> para identificação das cepas 3909 e 3910.....	79
Quadro 9 – Leitura do equipamento VITEK®2 <i>Compact</i> para identificação das cepas 3878 e 3905 (n=22).....	81
Quadro 10 – Leitura do equipamento VITEK®2 <i>Compact</i> para identificação das cepas 3379 e 3381.....	82
Quadro 11 – Resultado do <i>show detail</i> com algumas opções de possível identificação ou similaridade no perfil de proteínas identificado com base na análise em MALDI-TOF MS para as cepas identificadas como pertencentes aos complexos <i>E. agglomerans</i> e <i>E. cloacae</i> pelas provas bioquímicas convencionais.....	85
Figura 1 – Esquema mostrando o gene <i>rrs</i> e os iniciadores utilizados no sequenciamento.....	65
Figura 2 – Amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, de acordo com o ano de encaminhamento, para um total de 134 amostras.....	69
Figura 3 – Percentual de amostras de NP encaminhadas ao INCQS de acordo com a modalidade de análise no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.....	70
Figura 4 – Motivo da apreensão das amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.....	71
Figura 5 – Resultado do ensaio de esterilidade das amostras de NP no período de janeiro de	

2000 a dezembro de 2016, para um total de 113 amostras.....	71
Figura 6 – Resultado final do laudo analítico das amostras de NP analisadas no INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 128 amostras analisadas...	72
Figura 7 – Tempo decorrido entre a apreensão até a entrada da amostra de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.....	73
Figura 8 – Volume das amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016 , para um total de 134 amostras.....	74
Figura 9 – Órgãos de Vigilância Sanitária responsáveis pelas apreensões de amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.....	74
Figura 10 – Percentual de amostras de NP que foram encaminhadas ao INCQS de acordo com a região de origem no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.....	75
Figura 11 – Dendrograma elaborado pelo <i>software</i> interno do equipamento VITEK®MS RUO, considerando o percentual de semelhança entre os espectros obtidos.....	86
Figura 12 – Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene <i>rrs</i> . A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A sequência do gene <i>rrs</i> da espécie <i>Bradyrhizobium centrosematis</i> foi utilizada como “ <i>out group</i> ”	88
Figura 13 – Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene <i>rrs</i> . A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A sequência do gene <i>rrs</i> da espécie <i>Xenorhabdus nematophila</i> foi utilizada como “ <i>out group</i> ”. Tamanho total do conjunto de dados: 1.334 pb.....	90
Figura 14 – Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene <i>atpD</i> . A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie <i>Xenorhabdus nematophila</i> foi utilizada como “ <i>out group</i> ”. Soma do comprimento do ramo = 0.63310711. Tamanho total do conjunto de dados: 603 pb.....	92
Figura 15 – Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene <i>gyrB</i> . A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie <i>Xenorhabdus nematophila</i> foi utilizada como “ <i>out group</i> ”. Soma do comprimento do ramo = 1.05442831.	

Tamanho total do conjunto de dados: 624 pb.....	93
Figura 16 – Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene <i>infB</i> . A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie <i>Xenorhabdus nematophila</i> foi utilizada como “out group”. Soma do comprimento do ramo = 1.04646162.	
Tamanho total do conjunto de dados: 598 pb.....	94
Figura 17 – Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene <i>rpoB</i> . A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie <i>Xenorhabdus nematophila</i> foi utilizada como “out group”. Soma do comprimento do ramo = 0.65966452.	
Tamanho total do conjunto de dados: 582 pb.....	95
Figura 18 – Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências concatenadas dos genes <i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>infB</i> e <i>rpoB</i> . A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie <i>P. agglomerans</i> foi utilizada como “out group”. Soma do comprimento do ramo = 0.71595661. Tamanho total do conjunto de dados: 2.407 pb.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado das provas bioquímicas realizadas para as cepas 3909 e 3910, identificadas como <i>R. radiobacter</i>	80
Tabela 2 – Resultado das provas bioquímica realizadas nas 24 cepas.....	83
Tabela 3 – Identificação das cepas de enterobactérias feita na base de dados EzBioCloud, com comparação entre sequências do gene <i>rrs</i>	89
Tabela 4 – Resultado da identificação, de acordo com os métodos utilizados, e do teste de susceptibilidade à antimicrobianos por cepa estudada.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5KG	5-Queto-D-Gluconato
ADO	Adonitol
AGAL	Alfa-Galactosidase
AGLTp	Glutamil Arilamidase pNA
AGLU	Alfa-Glucosidase
AMH	Agar Mueller-Hinton
AN	Agar Nutriente
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Índice de Perfil Analítico
APPA	Ala-Fe-Pro Arilamidase
AP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Primer Arbitrário
AS	Agar Sangue
ATCC	American Type Culture Collection
BAIap	Beta-Alanina arilamidase pNA
BGAL	Beta-Galactosidase
BGN	Bacilo Gram Negativo
BGLU	Beta-Glucosidade
BGUR	Beta-Glucoronidase
BHI	Infusão Cérebro-Coração
BNAG	Beta-N-Acetil-Glucosaminidase
BPPNP	Boas Práticas de Preparação de Nutrição Parenteral
BXYL	Beta-Xilosidase
CCHA	Ácido α -hidroxicinâmico
CIT	Citrato
CLSI	<i>The Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMT	Cumarato
CN	Caldo Nutriente
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
dCEL	D-Celobiose
dCTP	DesoxiCitosina Trifosfatada
dGLU	D-glicose
DM	Departamento de Microbiologia

dMAL	D-Maltose
dMAN	D-Manitol
dMNE	D-manose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DOU	Diário Oficial da União
dSOR	D-Sorbitol
DSM	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>
dTAG	D-Tagatose
dTRE	D-Trealose
ELLM	ELLMAN
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GGAA	Glu-Gli-Arg-Arilamidase
GGT	Gama-Glutamil-Transferase
GlyA	Assimilação Glicina Arilamidase
GM	Gabinete Ministerial
H ₂ S	Produção de H ₂ S
I	Imprescindível
IARL	L-Arabitol
IHISa	Assimilação L-Histidina
ILATa	Assimilação L-Lactato
ILATk	Alcalinização L-Lactato
IMLTa	Assimilação L-Malato
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INF	Informativo
LDC	Lisina Descarboxilase
LIP	Lipase
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization – Time of flight</i>
MDD	Método de Difusão em Disco
MGP	metil- α -D-glicopiranosídeo.
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MNT	Malonato

MR-VP	Vermelho de metila-Voger Proskauer
MS	Ministério da Saúde
N	Necessário
NAGA	Beta-N-Acetil-Galactosaminidase
NE	Não Executado
nm	nanômetro
NP	Nutrição Parenteral
NPS	Nutrição Parenteral Suplementar
NPT	Nutrição Parenteral Total
O129R	Resistência O/129
ODC	Ornitina Descarboxilase
OFF	Fermentação/Glicose
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PHOS	Fosfatase
PLE	Palatinose
POP	Procedimento Operacional Padronizado
ProA	L-Prolina Arilamidase
p/v	peso/volume
PyrA	L-Pirrolidonil-Arilamidase
q.s.p	quantidade suficiente para
R	Recomendável
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase de Elementos Palindrômicos Extragênicos Repetitivos
RNA	ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
SAC	Sacarose
SESA	Secretaria de Estado da Saúde
SGAweb	Sistema de Gerenciamento de Amostra
SISLAB	Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública

SUCT	Alcalinização Succinato
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TAA	Termo de Apreensão de Amostra
TF	Tioglicolato Fluido
TNP	Terapia de Nutrição Parenteral
TSA	Agar Trypticaseína de Soja
TSB	Caldo Trypticaseína de Soja
TyrA	Tirosina Arilamidase
UCIP	Unidade de Cuidados Intensivos Pediátrica
URE	Urease
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIN	Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal
v/v	volume-volume
VISA	Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	233
1.1 Nutrição parenteral	244
1.1.1 Histórico	244
1.1.2 Conceito.....	255
1.2 Legislação específica para terapia de nutrição parenteral	266
1.3 Controle de qualidade	29
1.3.1 Ensaio de esterilidade	300
1.3.2 Controle de qualidade na farmácia de manipulação	311
1.4 Segurança do paciente.....	322
1.5 Contaminação em nutrição parenteral.....	34
1.6 Família enterobacteriaceae	44
1.7 Família rhizobiaceae.....	45
1.8 Métodos de identificação de micro-organismos	46
1.8.1 Métodos fenotípicos	47
1.8.1.1 Métodos proteômicos.....	47
1.8.2 Métodos genotípicos.....	48
1.8.2.1 Sequenciamento de genes	49
1.9 Resistência aos antimicrobianos	511
1.10 Justificativa	53
2 OBJETIVO.....	55
2.1 Objetivo geral.....	55
2.2 Objetivos específicos.....	55
3 METODOLOGIA.....	56
3.1 Levantamento de dados	56
3.1.1 Busca no Sistema Harpya e Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA).....	56
3.1.2 Análise de processos documentais.....	566
3.2 Cepas bacterianas	56
3.3 Identificação fenotípica das cepas	58
3.4 Identificação proteômica em MALDI-TOF MS	59
3.5 Identificação genotípica das cepas	60
3.5.1 Extração de DNA.....	60
3.5.2 Amplificação por PCR.....	61

3.5.2.1 Gene <i>rrs</i>	611
3.5.2.2 Genes <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>atpD</i> , <i>infB</i> (MLSA)	61
3.5.3 Purificação do fragmento amplificado	63
3.5.4 Sequenciamento dos genes <i>rrs</i> , <i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>infB</i> e <i>rpoB</i>	644
3.5.5 Análise das sequências nucleotídicas	65
3.5.6 Análise filogenética	65
3.6 Susceptibilidade aos antimicrobianos	66
4 RESULTADOS.....	68
4.1 Levantamento de dados e análise de processos documentais	68
4.1.1 Número de amostras encaminhadas por ano	68
4.1.2 Modalidade de análise	69
4.1.3 Amostras canceladas.....	70
4.1.4 Motivo de apreensão.....	70
4.1.5 Resultado do ensaio de esterilidade.....	711
4.1.6 Resultado final do laudo analítico	72
4.1.7 Forma de coleta	72
4.1.8 Tempo entre a coleta e a entrada de amostra no INCQS	723
4.1.9 Volume da amostra	73
4.1.10 Órgão fiscalizador.....	74
4.1.11 Região de origem.....	74
4.1.12 Surtos relatados na documentação encaminhada com as amostras	75
4.1.12.1 Surto 1	75
4.1.12.2 Surto 2	76
4.1.12.3 Surto 3	77
4.1.12.4 Surto 4	77
4.2 Identificação fenotípica das cepas.....	78
4.2.1 Cepas 3909 e 3910.....	78
4.2.2 Cepas 3379, 3381 e 3878 a 3905.....	80
4.3 Identificação proteômica por MALDI-TOF MS.....	84
4.4 Identificação genotípica das cepas	86
4.4.1 Análise da sequência do gene <i>rrs</i>	87
4.4.1.1 Cepas bacterianas 3909 e 3910.....	87
4.4.1.2 Cepas bacterianas 3379, 3381 e 3878 a 3905.....	88
4.4.2 Multilocus sequence analysis (MLSA).....	91

4.5 Susceptibilidade aos antimicrobianos	97
5 DISCUSSÃO	100
6 CONCLUSÃO.....	115
REFERÊNCIAS	116
ANEXO A	138

1 INTRODUÇÃO

A via parenteral de nutrição é usada como alternativa quando o quadro clínico do paciente não o permite absorver e digerir alimentos pelo sistema digestório. Diante disso, a nutrição parenteral (NP) é feita exclusivamente para aquele paciente, tendo em sua composição aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais em quantidades ajustadas para suprir suas necessidades metabólicas para síntese e manutenção de tecidos, órgãos e sistemas. Por ser uma infusão intravenosa, ela deve seguir parâmetros estabelecidos por normas, tendo que ser obrigatoriamente estéril e apirogênica para se garantir o bem-estar e saúde do usuário (BRASIL, 1998). Para isso, é necessário que se tenha rigor durante a manipulação dessas soluções, respeitando-se normas e condições assépticas.

Ao longo da história, desde sua implementação, as nutrições parenterais têm sido causadoras de diversos surtos em hospitais e de óbitos no mundo inteiro devido à presença de contaminação microbiana (WILLIAMS *et al.*, 1985; VAN ROSTENBERGHE *et al.*, 2006; RIO DE JANEIRO, 2013; KÔSE *et al.*, 2016). Por isso, uma das complicações da terapia com NP é a contaminação microbiológica, principalmente por bactérias ambientais, que são incomuns em infecções e dificilmente são identificadas por provas fenotípicas em sistemas de identificação automatizados contendo banco de dados de origem clínica (CRUZ *et al.*, 2007; MONTALVO-JAVE *et al.*, 2007; PILLONETTO *et al.*, 2018). Essa dificuldade na identificação pode agravar o estado de saúde do paciente, pois não haverá dados concretos a respeito de sua susceptibilidade aos antimicrobianos, levando-se à troca frequente dos mesmos para o tratamento (TRAJANO; CALDAS, 2008).

A infecção de corrente sanguínea, relacionada à terapia intravenosa, é um importante fator nos custos hospitalares de morbidade e mortalidade, especialmente em unidades de terapia intensiva. A contaminação da NP pode ocorrer por componentes industrializados contaminados, durante o preparo, armazenamento e administração (KÔSE *et al.*, 2016). A taxa de contaminação durante a manipulação asséptica é baixa (5,2%), porém o risco é existente. Logo, é necessário que os estabelecimentos tenham implementado um sistema de gestão da qualidade, onde seus produtos sejam manipulados conforme a Portaria nº 272, de 8 de abril de 1998 (BRASIL, 1998).

A partir do momento do preparo, o transporte tem que ser feito em até 12 horas sob refrigeração (2 a 8°C), podendo ser utilizada em até 48 horas contadas a partir do horário da manipulação, respeitando um tempo de infusão de 24 horas (GILBERT *et al.*, 1986). A empresa deve guardar amostras sob refrigeração por 7 dias para realizar análises laboratoriais

e de contraprova caso seja necessário (BRASIL, 1998).

Todo o processo que envolve NP, desde a aquisição de insumos de qualidade até a administração, deve ser controlado e executado com rigor, assim como as ações de vigilância sanitária (VISA) no caráter de prevenção de risco, pois, apesar de problemas de contaminação serem pontuais, causam danos irreparáveis ao paciente.

1.1 Nutrição parenteral

1.1.1 Histórico

A NP possui grande importância clínica no tratamento e prevenção da desnutrição, que é uma causa relacionada à morbidade e à mortalidade (WRETLIND; SZCZYGIEL, 1998; DUDRICK, 2009). Não se conhece a data da sua implementação. Sua criação aconteceu através de uma sucessão de descobertas e tentativas, se iniciando com a descrição da circulação sanguínea por Harvey em 1628. Isso ampliou o conhecimento, passando-se a supor que os alimentos ingeridos, seriam transformados em moléculas menores e estas circulariam por todo o organismo através da corrente sanguínea (COELHO; BENARROZ; CALIXTO-LIMA, 2010). A partir desse pressuposto, novos estudos foram conduzidos na área da terapia intravenosa, dentre eles: técnicas de punção venosa, transfusão de sangue em humanos e administração de água, bicarbonato, solução de açúcares, leite e lipídeos na veia em animais (ROMBEAU; ROLANDELLI, 2005).

Durante a Primeira Guerra Mundial, era feita a administração venosa de solução de glicose a 5% em humanos para correção do estado de choque. Em 1937, Elman injetou em cães uma infusão venosa de proteínas na forma de hidrolisados de caseína suplementados com triptofano associado à metionina ou à cistina (ELMAN; WEINER, 1939). Todavia, esse modelo terapêutico apresentava limitações, levando-se em consideração que eram utilizados apenas aminoácidos como única fonte energética. O problema não solucionado por Elman e Weiner, que seria produzir um balanço nitrogenado positivo, foi demonstrado por estudos de Wretlind, em 1940. Este concluiu que o balanço nitrogenado positivo seria alcançado com o uso de aminoácidos em conjunto com outras fontes calóricas em quantidades corretas. Com isso, novos estudos surgiram para demonstrar, de forma segura, a infusão venosa de calorias provenientes de emulsões lipídicas e de solução de glicose (COELHO; BENARROZ; CALIXTO-LIMA, 2010).

A primeira emulsão lipídica, à base de óleo de algodão, foi criada por Frederick e

Robert, em 1960, porém foi retirada do mercado por fornecer efeitos adversos de ordem metabólica. Em 1961, foi desenvolvida uma nova emulsão lipídica que não causava reações adversas, à base de óleo de soja com o fosfatídio da gema do ovo, que posteriormente foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) (COELHO; BENARROZ; CALIXTO-LIMA, 2010). Dudrick *et al.* (1966) solucionaram um outro problema encontrado na administração da NP. Eles infundiram, em filhotes de cães, glicose hiperosmolar e hidrolisados de proteínas por meio de cateter em veia cava superior, o que até então não era possível, pois soluções concentradas de glicose poderiam causar trombose venosa profunda e, em concentrações menores, era requerido um alto volume de infusão. O experimento demonstrou tanto a manutenção nutricional quanto o desenvolvimento dos filhotes através do uso exclusivo e prolongado de NP (DUDRICK *et al.*, 1968). Este estudo foi o marco na criação de NP (BARSOUM; KLEEMAN, 2002).

A via de acesso central foi indicada em 1967, tendo sido usada com êxito durante 22 meses em uma recém-nascida. Essa via de acesso foi um outro ponto importante na implementação da NP, permitindo uma administração segura (COELHO; BENARROZ; CALIXTO-LIMA, 2010).

1.1.2 Conceito

As formulações de NP são elaboradas para fornecer nutrientes em doses suficientes para a necessidade diária do paciente, sendo uma mistura complexa, que pode apresentar 40 ou mais componentes (ROMBEAU; ROLANDELLI, 2005). No Brasil, é definida como:

Solução ou emulsão, composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais, estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente de vidro ou plástico, destinada à administração endovenosa em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando à síntese ou à manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (BRASIL, 1998, p. 2).

A elaboração de uma NP deve levar em consideração a estabilidade, compatibilidade e esterilidade da mistura final (ROMBEAU; ROLANDELLI, 2005). Por ser uma solução ou emulsão extemporânea, ou seja, não passa por processo de esterilização terminal, se faz necessária a utilização de insumos estéreis e técnicas assépticas de manipulação.

Atrelado a isso, seu uso pode ser dividido em duas classificações: nutrição parenteral

suplementar (NPS) ou nutrição parenteral total (NPT). A NPS é usada concomitantemente com um outro tipo de ingestão de calorias (PEREIRA *et al.*, 2010). A NPT é aplicada quando um paciente obtém através dela todas as necessidades nutricionais, sem ingestão enteral ou oral. Esse tipo de terapia deve ser prescrito por um médico e sua indicação está relacionada com o histórico clínico do paciente, ou seja, quando há impossibilidade do uso das vias oral e enteral para alimentação (BRASIL, 1998; PEREIRA *et al.*, 2010).

Outra classificação inerente às NPs é referente a sua composição, podendo ser dois em um, composta de açúcares e aminoácidos, e três em um, formada por açúcares, aminoácidos e lipídeos, acrescidos de vitaminas e eletrólitos.

1.2 Legislação específica para terapia de nutrição parenteral

No Brasil, a Terapia de Nutrição Parenteral (TNP) é considerada um “conjunto de procedimentos terapêuticos para manutenção ou recuperação do estado nutricional do paciente por meio de NP”, regulamentada pela Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/MS) nº 272/1998, que estabelece as condições mínimas para prescrição, produção, transporte, administração e controle clínico e laboratorial de NP e sua avaliação final. Para isso, a portaria adota diversas definições: Equipe Multiprofissional de Terapia Nutricional, uma equipe multidisciplinar formada por médico, farmacêutico, enfermeiro e nutricionista, todos com treinamento específico para a prática da TNP; farmácia de manipulação, definida como estabelecimento para a preparação de NP, devendo atender às Boas Práticas de Preparação de Nutrição Parenteral (BPPNP) (BRASIL, 1998; MASCARENHAS *et al.*, 2015).

A Portaria nº 272/1998 permite a contratação de serviços terceirizados de TNP, por meio de contratos formalizados, caso a unidade hospitalar não possua condições adequadas para a produção de NP. Intercorrências durante a TNP estão sujeitas às disposições previstas no Código de Defesa do Consumidor (BRASIL, 1990^a) e o descumprimento das recomendações da referida portaria sujeita os responsáveis às penalidades previstas na Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977 (BRASIL, 1977). Os estabelecimentos envolvidos na TNP estão sujeitos a inspeções sanitárias periódicas. Caso irregularidades ocorram, o órgão fiscalizador, Vigilância Sanitária (municipal ou estadual) ou Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), têm o direito de solicitar todos os documentos e registros necessários à solução do problema.

O Anexo V da referida portaria traz roteiros de inspeções aplicados aos

estabelecimentos envolvidos na TNP, categorizando os requisitos como informativo (INF), recomendável (R), necessário (N) ou imprescindível (I), com base no risco potencial oferecido. O não cumprimento dos itens classificados como I e N resulta em infrações passíveis de sanções aplicadas pelo órgão fiscalizador de Vigilância Sanitária. O não cumprimento de um item I resulta em suspensão imediata da atividade até seu cumprimento; de um item N, o estabelecimento fica sujeito a um prazo de adequação; e de um item R, ocorre uma orientação para adequação das atividades.

A Portaria nº 272/1998 estabelece que o médico seja responsável pela indicação e prescrição da NP; o farmacêutico, pela preparação; o enfermeiro, pela administração; e o nutricionista, por avaliar o estado nutricional do paciente e suas necessidades calóricas diárias. O preparo engloba as etapas de desenvolvimento da NP: avaliação da prescrição, manipulação, controle de qualidade, conservação e transporte (Quadro 1).

Ao final da preparação, deve ser feita uma amostragem de cada sessão de manipulação ($\sqrt{N + 1}$) para avaliação microbiológica e deve ser retirada de cada NP preparada uma amostra de contraprova, conservada sob refrigeração (temperatura controlada) durante 7 dias. A sessão de manipulação é definida como “tempo decorrido para uma ou mais manipulações de NP, sob as mesmas condições de trabalho, por um mesmo manipulador, sem qualquer interrupção do processo”.

De forma geral, essa portaria foi criada para estabelecer os requisitos básicos para infraestrutura, manipulação, administração e formação de uma equipe de profissionais específicos para todo o procedimento que envolve a TNP, tornando-a passiva de fiscalização a fim de garantir sua qualidade e segurança (PRIMO *et al.*, 2012).

Quadro 1 – Etapas da Terapia de Nutrição Parenteral.

Etapas	Condições exigidas pela Portaria SVS/MS nº 272/1988
Indicação e prescrição	O médico é o responsável pela indicação da NP e prescrição da terapia nutricional, que deve ser precedida da avaliação do paciente.
Preparo	O farmacêutico é responsável pela avaliação farmacêutica da prescrição da NP e manipulação da solução com base nas Boas Práticas de Preparo de Nutrição Parenteral (BPPNP).
Conservação	Imediatamente após o preparo e durante todo e qualquer transporte, a NP deve ser mantida sob refrigeração (2°C a 8°C), exceto nos casos de administração imediata.
Transporte	O Farmacêutico é o responsável pela manutenção da qualidade da NP até a sua entrega ao profissional responsável pela administração, e orientação e treinamento dos funcionários que realizam o seu transporte.
Administração	O Enfermeiro é o responsável pela administração das soluções, que deve ser executada de forma a garantir ao paciente uma terapia segura e que permita a máxima eficácia, em relação aos custos, utilizando materiais e técnicas padronizadas.
Controle clínico e laboratorial	Deve contemplar: ingressos de nutrientes, tratamentos farmacológicos concomitantes, sinais de intolerância à NP, alterações antropométricas, bioquímicas, hematológicas e hemodinâmicas, assim como modificações em órgãos e sistemas cujas funções devem ser verificadas periodicamente.
Avaliação final	Antes da interrupção/suspensão da NP, o paciente deve ser avaliado em relação à capacidade de atender às suas necessidades nutricionais por via digestiva e à presença de complicações que ponham o paciente em risco de vida.

Legenda: SVS: Secretaria de Vigilância Sanitária; MS: Ministério da Saúde, NP: nutrição parenteral.
 Fonte: (MASCARENHAS *et al.*, 2015).

1.3 Controle de qualidade

A Farmacopeia Brasileira define controle de qualidade como um “conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade” (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A verificação da conformidade das especificações deve ser vista como um requisito necessário para a garantia da qualidade, da segurança e da eficácia do produto e não somente como uma exigência regulatória (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Desse modo, a análise de controle de qualidade é tratada como uma fonte de informações que gera uma ação efetiva de VISA (CORREA, 2003).

O controle de qualidade tem como objetivo principal avaliar o produto acabado, para que se verifique o atendimento das especificações pertinentes pelas empresas. É importante tanto para o sistema de inspeção da Vigilância Sanitária quanto para uma autoinspeção do fabricante, a qual pode ser feita em diversos pontos críticos da cadeia produtiva, ajudando a identificar falhas nos processos e garantindo a segurança do produto final (BRASIL, 1977). Por isso, todo estabelecimento que está sujeito às normas sanitárias deve possuir um departamento que seja encarregado do controle de qualidade (BRASIL, 1976).

As análises de controle de qualidade dos produtos são realizadas por laboratórios integrantes do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB), que são instrumentos fundamentais para a execução de ações da VISA. Fazem parte dessa rede, 27 Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e outros laboratórios públicos credenciados (BRASIL, 2004). Porém não são todos que realizam análises de medicamentos ou possuem condições técnicas para avaliar a qualidade microbiológica de um produto de uso parenteral (CORRÊA, 2003; SOUTO, 2008).

Uma vez que o produto é apreendido por um agente fiscalizador de Vigilância Sanitária, conforme os procedimentos estabelecidos por lei (BRASIL, 1977), ele é encaminhado aos laboratórios oficiais citados acima para a realização das análises de controle de qualidade. As modalidades de análise de amostras relacionadas a evento adverso e recebidas no INCQS são: análise fiscal e análise de orientação.

As análises de orientação não estão previstas em lei e podem ser solicitadas pelos órgãos oficiais, como Poder Judiciário, Ministério da Saúde e mesmo órgãos de fiscalização, a fim de fornecer suporte aos órgãos de Vigilância Sanitária quando a natureza, forma de coleta

ou finalidade da análise não permita a realização de análise fiscal (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 211). Por não estar descrita na legislação, a análise de orientação não pode instaurar processos fiscais, mas pode culminar em inspeções sanitárias e coleta de amostras fiscais quando existir um laudo insatisfatório (LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ, 2014).

1.3.1 Ensaio de esterilidade

Quando uma amostra de NP é apreendida e encaminhada ao laboratório de análise, ela é submetida a ensaios de acordo com o motivo de apreensão. Dentre os ensaios preconizados, pode ser realizado o teste de esterilidade, para verificar a qualidade desse parâmetro exigido pela Portaria 272/1998 (BRASIL, 1998).

A esterilidade é definida como a ausência de micro-organismos viáveis. Em um produto estéril não devem ser encontrados micro-organismos viáveis, capazes de se multiplicar ou de se desenvolver mesmo que em condições favoráveis (BUGNO, 2001; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os produtos de uso parenteral devem ser estéreis pelo risco associado ao seu uso no organismo devido à via de administração. Para que esse parâmetro seja garantido, é realizado o ensaio de esterilidade, que faz parte do escopo de ensaios de controle de qualidade, que visa pesquisar a presença de bactérias e fungos viáveis. Ele pode ser realizado pela técnica de inoculação direta, quando a amostra é transferida diretamente para o tubo contendo o meio de cultura, ou através da técnica de filtração por membrana, na qual a amostra passa por um processo de filtração e a membrana filtrante é inoculada no meio de cultura.

Os meios de cultura utilizados são caldo tripticaseína de soja (TSB), incubado a $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ e tioglicolato fluido (TF), a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 14 dias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). As quantidades amostrais são preconizadas pela Farmacopeia Brasileira (volume 1, item 5.5.3.2.1), variando de acordo com a natureza do produto (ex.: forma farmacêutica e número de unidades de um lote). O método de avaliação da esterilidade por filtração em membrana é, geralmente, o de primeira escolha quando existe a possibilidade de ser aplicado, respeitando-se as exigências do compêndio oficial. No caso da NP, utiliza-se o método direto.

O ensaio de esterilidade se baseia no crescimento microbiano nos tubos contendo meios de cultura (TSB e TF), sendo feita a confirmação do resultado positivo por meio da avaliação visual do meio quanto à turvação, em um período de 14 dias. O ensaio de

esterilidade detecta micro-organismos capazes de crescer nos meios de cultura utilizados e a amostragem dá uma estimativa sobre a esterilidade de todas as unidades do lote (LIRA, 2013).

1.3.2 Controle de qualidade na farmácia de manipulação

A garantia da qualidade no processo de produção de NP se inicia no momento em que a farmácia de manipulação realiza a aquisição dos insumos que serão utilizados na elaboração do produto final. Isso torna necessário que o produtor do insumo seja qualificado e que seus produtos tenham passado por rigorosos ensaios de controle, pois irão interferir na qualidade final da NP que será ofertada ao paciente. A esterilidade e pureza são características fundamentais desses insumos (ELAMIN; NORRI, 2010).

Outro ponto importante no processo de manipulação é a análise de prescrição feita pelo farmacêutico. Tem a finalidade de observar se existem constituintes incompatíveis entre si ou em quantidades inadequadas para o tipo de paciente para qual a NP é requerida (ELAMIN; NORRI, 2010).

A estabilidade físico-química e microbiana de uma NP é essencial para a segurança do paciente e eficácia específica do produto final, e sua garantia requer conhecimento farmacêutico especializado. A garantia de qualidade é um aspecto importante da terapia de NP. Um modo de garantir a qualidade é pela aplicação de técnica asséptica e validação de manipuladores (BRASIL, 1998), pois quanto maior o número de manipulações de uma única formulação, maior a probabilidade de ocorrer contaminação (MÜHLEBACH *et al.*, 2009). Sendo assim, a realização de treinamento da equipe de manipuladores de NP visa diminuir o risco de contaminação, visto que a má técnica asséptica inadequada pode levar à contaminação do produto (TURPIN *et al.*, 2011).

O treinamento dos manipuladores e o equipamento utilizado no envase da NP são validados por uma técnica chamada *media fill*. Devido ao risco de erro humano e grande número de insumos utilizados, a NP é envasada por meio de equipamento com sistema automatizado (AMERICAN SOCIETY OF PHARMACEUTICAL HEALTH SYSTEMS, 2000). Um estudo realizado nos Estados Unidos verificou uma taxa de 5,2% (539 ensaios de técnica asséptica) de contaminação durante avaliação de funcionários de uma farmácia de manipulação na execução da técnica de *media fill* (TRISSEL *et al.*, 2005).

O *media fill* é uma simulação do processo de preparo da NP, no qual se utiliza meio de cultura estéril em vez de insumos farmacêuticos, seguindo todos os procedimentos descritos

de manipulação. Ao final da sessão, a bolsa preparada com o meio de cultivo do *media fill* é incubada para verificar se ocorrerá crescimento de micro-organismo (TRISSEL *et al.*, 2005; AUAD, 2010). Esse teste visa à ausência de crescimento microbiano na bolsa, garantindo que o manipulador esteja apto para produzir uma NP isenta de contaminação microbiana.

O controle de qualidade do processo de manipulação também deve ser realizado na qualificação e validação de áreas limpas. De acordo com a Portaria nº 272/1998, a NP deve ser manipulada em área limpa grau A ou B (classe 100) ou sob fluxo laminar, circundada por área grau C (classe 10.000). A limpeza e higienização dos produtos farmacêuticos, correlatos e materiais de embalagem, utilizados na manipulação, devem ser executadas em área grau D (classe 100.000). Todas as áreas controladas são submetidas à limpeza, higiene e sanitização periódicas, além de ensaios para contagem de partículas no ar, controle de pressão, temperatura e umidade das salas, controle ambiental microbiológico do ar e de superfícies das salas (AUAD, 2010). Todos esses controles devem estar descritos em Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) internos de cada farmácia de manipulação.

Para o controle e garantia da qualidade microbiológica do produto final (ausência de micro-organismo), os estabelecimentos inoculam uma alíquota da NP em um frasco contendo meio de cultura de enriquecimento, como por exemplo, caldo infusão cérebro-coração (BHI), TSB. Esse frasco é incubado em um equipamento com temperatura controlada, onde a leitura é feita de forma automática com o uso de membrana sensível a dióxido de carbono, sendo possível a verificação da presença de crescimento microbiano em até 24 horas (ZINGG; TOMASKE; MARTIN, 2012; LIRA, 2013). Essa técnica também necessita de validação para substituir o ensaio de esterilidade, que é o preconizado pela Portaria nº 272/1998 para ser executado no caso de análise fiscal da NP.

O transporte da NP também faz parte do controle de processo, pois pode influenciar na qualidade final da formulação preparada. Ele é realizado em temperatura controlada, de 2 a 8°C e no período máximo de 12 horas (BRASIL, 1998).

De forma geral, segundo Boszczowski *et al* (2012), “protocolos rigorosos de boas práticas devem ser assegurados para evitar a contaminação, devendo incluir educação contínua sobre boa qualidade da higiene das mãos e observação rigorosa do controle ambiental na área de manuseio”.

1.4 Segurança do paciente

Apesar da NP ser uma ferramenta importante no combate à desnutrição em pacientes,

é considerada uma terapia de alto risco, necessitando de cuidados para garantir a sua segurança (MASCARENHAS *et al.*, 2015). A TNP é considerada crítica pela sua característica multidisciplinar, assim como a complexidade das formulações, tornando o processo de manipulação criterioso (VILLAFRANCA *et al.*, 2014).

A Segurança do Paciente é um dos seis atributos da qualidade do cuidado, sendo o tema abordado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na 57ª Assembleia Mundial de Saúde (BRASIL, 2013a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). É definida pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 36, de 25 de julho de 2013 como “redução, a um mínimo aceitável, do risco de dano desnecessário associado à atenção à saúde” (BRASIL, 2013a). Devido a sua importância, foi criado o Programa Nacional de Segurança do Paciente, que é instituído pela Portaria do Gabinete Ministerial do Ministério da Saúde (GM/MS) nº 529, de 1 abril de 2013 (BRASIL, 2013b).

Dentre os seis protocolos básicos de segurança do paciente, instituídos pela Portaria GM/MS nº 2.095, de 24 de setembro de 2013, está a segurança na prescrição, uso e administração de medicamentos. A NP pode ser alocada nesse protocolo citado (BRASIL, 2013c). Essas três normas enfatizam a importância de uma equipe multidisciplinar, da elaboração de protocolos e comunicação entre os profissionais envolvidos para que a segurança seja garantida, reduzindo-se o risco. Para isso, a Resolução RDC nº 36/2013 define dano como “comprometimento da estrutura ou função do corpo e/ou qualquer efeito dele oriundo, incluindo doenças, lesão, sofrimento, morte, incapacidade ou disfunção, podendo, assim, ser físico, social ou psicológico” (BRASIL, 2013a).

Qualquer caso de intercorrências com NP pode gerar um dano ao paciente, principalmente quando ocorre algum incidente, no qual resulta em um dano desnecessário à saúde. Desse modo, todos os profissionais e estabelecimentos envolvidos na TNP devem prezar pela garantia de segurança do paciente, adotando procedimentos de garantia da qualidade e gerenciamento do risco. A Portaria nº 272/1998 exige que a farmácia de manipulação, produtora da bolsa de NP, notifique aos hospitais para onde as mesmas foram encaminhadas, caso haja alguma irregularidade, a fim de que a administração seja interrompida e seja iniciada uma terapia com antimicrobiano (BRASIL, 1998).

Quando uma NP contaminada é administrada em um paciente, o mesmo terá grandes chances de desenvolver uma infecção da corrente sanguínea. De acordo com Turpin *et al.* (2011), evitar esse tipo de infecção é um importante passo para a promoção da segurança do paciente, reduzindo potencialmente as taxas de mortalidade durante uma internação hospitalar.

De modo a executar a regulação dos produtos suspeitos de terem desvio da qualidade, a Anvisa emite Comunicados de Risco e Notas Técnicas para orientação de profissionais de saúde, de fabricantes e da população, informando a gravidade do caso ou a suspensão do produto. Esses informes são regulamentados e publicados no Diário Oficial da União (DOU) como Resolução-RE (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014).

1.5 Contaminação em nutrição parenteral

Apesar das boas práticas de manipulação de NP estarem bem estabelecidas, a contaminação desses produtos ainda é observada. Ao longo dos anos existem diversas publicações relatando o problema e os danos causados aos pacientes (ALLWOOD, 1997; DISSANAIKE *et al.*, 2007; OPILLA, 2008; TURPIN *et al.*, 2011).

Por ser um produto extemporâneo, não submetido a esterilização terminal, torna ainda mais crítico o seu processo de produção. A contaminação das NPs pode ser atribuída à ausência de técnica asséptica adequada no processo de manipulação (WILLIAMS *et al.*, 1985; HABSAH *et al.*, 2005; ROMBEAU; ROLANDELLI, 2005; ZINGG; TOMASKE; MARTIN, 2012) ou na aquisição de componentes previamente contaminados (RIO DE JANEIRO, 2013; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014). A NP, por se tratar de uma solução nutritiva, é considerada uma boa fonte de crescimento para micro-organismos (ALLWOOD, 1997; BANTON, 2006). Existem diversos estudos publicados demonstrando o crescimento de bactérias e fungos nesse tipo de produto (MAKI; MARTIN, 1975; GILBERT *et al.*, 1986; KUWAHARA *et al.*, 2010).

Apesar de estarem presentes diversos nutrientes, os lipídeos e o pH próximo de 6,0 são os principais fatores que favorecem o crescimento de bactérias. Os fungos têm melhor adaptação a diferentes tipos de composição e de pH (KUWAHARA *et al.*, 2010).

Na literatura, a maior parte das bactérias causadoras de problemas relacionados a NP são Gram negativas e pertencentes à família Enterobacteriaceae (ZINGG; TOMASKE; MARTIN, 2012). Porém, pode-se observar também fungos como contaminantes desse tipo de produto. O gênero *Candida* é o mais frequentemente isolado em NP (GUDUCUOGLU *et al.*, 2016).

O Quadro 2 apresenta micro-organismos encontrados em NP e casos de infecção relacionados à NP.

Quadro 2 – Casos de infecção relacionados à contaminação de NP.

Micro-organismos	Fonte de isolamento	Nº casos	Local	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Hemocultura, cateter e emulsão lipídica administrada	1 criança	Nashville, Estados Unidos	MCKEE et al, 1979
<i>K. pneumoniae</i> e <i>E. cloacae</i>	Hemocultura	5 crianças	Atlanta, Estados Unidos	JARVIS et al, 1983
<i>E. cloacae</i>	Hemocultura e linha de produção da NP	6 recém-nascidos	Gantes, Bélgica	VERSCHRAEGEN et al, 1988
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Hemocultura, cateter e NP	4 adultos e idosos	Barcelona, Espanha	LLOP et al, 1993
<i>Serratia odorífera</i>	Hemocultura, NP, isolador	8 recém-nascidos	Joanesburgo, África do Sul	FREAN et al, 1994
<i>E. cloacae</i>	NP, encanamento da pia próxima a local de manipulação	4 crianças	Manchester, Inglaterra	FOSTER, 1994; INDEPENDENT, 1995
<i>E. cloacae</i>	Hemocultura e NP	10 recém-nascidos	Campinas, São Paulo, Brasil	TRESOLDI et al, 2000
<i>E. cloacae</i> e <i>E. agglomerans</i>	Hemocultura e NP	49 pacientes (adultos e neonatos)	Campinas, São Paulo, Brasil	GONÇALVES et al, 2000
<i>Pichia anômala</i>	Hemocultura e NP	11 recém-nascidos	São Paulo, SP, Brasil	ARAGAO et al, 2001
<i>Burkholderia cepacia</i>	Hemocultura e Sistema de fechamento de emulsões lipídicas	6 recém-nascidos e 1 bebê	Paris, França	DOIT et al, 2004
<i>Pantoea</i> spp.	Hemocultura, NP, líquido cefalorraquidiano	8 recém-nascidos	Kota Bharu, Malásia	HABSAH et al, 2005; VAN ROSTENBERGHE et al, 2006
<i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Acinetobacter</i> spp.	Hemocultura e NP	24 recém-nascidos	Mérida, Venezuela	VEGAS et al, 2006
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Hemocultura e NP	19 recém-nascidos	Rio de Janeiro, Niterói (RJ), Brasil	CAMPOS et al, 2007
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Hemocultura e abas e tubulação utilizadas no preparo da NP	48 pacientes, sendo 11 recém-nascidos	Corunha, Espanha	BOU et al, 2008
<i>Serratia marcescens</i>	Hemocultura e NP	7 recém-nascidos	Selçuk, Turquia	ARSLAN et al, 2010
<i>S. marcescens</i>	Hemocultura, NP e torneira na farmácia que foi utilizada para enxaguar equipamento de envase.	19 adultos em seis hospitais	Alabama, Estados Unidos	SACKS, 2011
<i>S. marcescens</i>	Hemocultura, NP e torneira na farmácia que foi utilizada para enxaguar equipamento de envase.	19 adultos em seis hospitais	Alabama, Estados Unidos	SACKS, 2011

Quadro 2 (cont.) – Casos de infecção relacionados à contaminação de NP.

Micro-organismos	Fonte de isolamento	Nº casos	Local	Referência
<i>S. marcescens</i>	Hemocultura e dreno da pia envolvida no preparo de NP	20 recém-nascidos	Atenas, Grécia	MALTEZOU et al, 2012
<i>Bacillus cereus</i>	Hemocultura, NP, ambiente da planta da empresa de manipulação, insumos utilizados no preparo.	23 recém-nascidos	Basildon, Brighton, Cambridge, Londres Luton, Peterborough, Southend-on-Sea, Aylesbury, Inglaterra	PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2014
Micro-organismos	Fonte de isolamento	Nº casos	Local	Referência
<i>Rouxiella chamberiensis</i>	NP	4 bebês	Chambery, França	LE FLÈCHE-MATÉOS et al, 2015
<i>E. cloacae</i>	Hemocultura, NP, soluções de glicose e aminoácidos	13 recém-nascidos	Esmirna, Turquia	KÔSE et al, 2016
<i>Candida albicans</i>	Hemocultura e NP	7 recém-nascidos	Tuşba/Van, Turquia	GUDUCUOGLU et al, 2016
<i>P. diazotrophicus</i> , <i>R. radiobacter</i> e <i>A. baumannii</i>	Hemocultura, NP e Gluconato de cálcio.	56 pacientes	Curitiba (PR), Porto Alegre (RS), Belo Horizonte (MG), Mogi Mirim (SP), Brasil	PILLONETTO et al, 2018

Legenda: NP: nutrição parenteral; RJ: Rio de Janeiro; PR: Paraná. RS: Rio Grande do Sul; MG: Minas Gerais; SP: São Paulo; *P.*: *Phytobacter*; *R.*: *Rhizobium*.

Fonte: (Adaptado de ZINGG; TOMASKE; MARTIN, 2012).

Como observado no Quadro 2, diversos surtos foram causados por NP contaminada ao longo dos anos. No trabalho de Mckee et al (1979), os autores relataram dois episódios distintos de sepse associada à NP contaminada no Hospital Universitário de Vanderbilt, em Nashville, em um mesmo paciente. A bactéria *K. pneumoniae* foi isolada de hemocultura, cateter e emulsão lipídica, tendo a sua contaminação classificada como extrínseca, por fazer parte da microbiota humana. A contaminação por *S. maltophilia* não foi elucidada. Eles demonstraram que *S. maltophilia* tinha crescimento satisfatório em NP.

De acordo com Jarvis et al (1983), outros casos de bacteremia ocorreram em cinco dos 20 pacientes internados na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTIN), em Atlanta, em 1981. Os micro-organismos *K. pneumoniae* e *E. cloacae* foram isolados de hemocultura e

foi realizado um estudo de caso-controle entre janeiro de 1979 e maio de 1981 para elucidação da fonte de contaminação. O estudo epidemiológico sugeriu que a emulsão lipídica estava contaminada com tais micro-organismos, sendo considerada contaminação extrínseca devido a retiradas sucessivas de alíquotas da garrafa.

Em um surto descrito por Verschraegen et al (1988), seis neonatos adquiriram infecção da corrente sanguínea após o uso de NP em Gantes, na Bélgica. Apesar da bactéria *E. cloacae* não ter sido isolada da NP, a mesma foi obtida de hemocultura e de tubulações envolvidas no preparo desse produto.

No estudo de Llop et al (1993), foi relatado um surto no Hospital de Llobregat, em Barcelona, comprometendo quatro pacientes, com idade entre 48 e 74 anos. O micro-organismo, *S. saprophyticus*, foi isolado da hemocultura em dois pacientes, da NP e do cateter, nos quatro pacientes. O controle microbiológico da NP foi feito a partir de uma amostragem de 10 mL, inoculando-se 3 mL em caldo BHI com dupla concentração. Os autores realizaram um ensaio para demonstrar o crescimento da cepa em NP, que foi positivo tanto a 25°C quanto a 37°C. Não foi informado como a identificação foi realizada.

Um surto causado pela bactéria *S. odorifera* biotipo I acometeu oito neonatos em quatro diferentes hospitais de Joanesburgo, na África do Sul, em setembro de 1992 (FREAN et al., 1994). Essa bactéria foi isolada em hemocultura, NP, isolador (local de manipulação da NP) e tecidos hepático e pulmonar após o óbito de alguns pacientes. A ribotipificação confirmou que todas cepas eram idênticas.

Apesar da bactéria *S. odorifera* ter sido isolada da área limpa (isolador), o mecanismo de contaminação não foi elucidado. As NPs contaminadas eram compostas por aminoácidos e glicose; e aminoácidos, glicose e emulsão lipídica. Os autores afirmaram que o isolador pode ter sido contaminado através de contato com o ar do ambiente externo ou por derramamento de um insumo contaminado previamente (contaminação intrínseca). A descontaminação e limpeza do isolador eram realizadas periodicamente, logo, a contaminação desses produtos pode indicar falhas nesses procedimentos. Além disso, eles enfatizaram a necessidade de amostras com um volume considerável para que baixos níveis de contaminação sejam detectados.

Em abril de 1994, no Hospital Royal Manchester Children, na Inglaterra, quatro crianças que faziam tratamento para leucemia foram acometidas pela bactéria *E. cloacae*, das quais, duas foram a óbito (FOSTER, 1994; INDEPENDENT, 1995). As crianças tiveram contato com essa bactéria através do uso de NP contaminada. De acordo com os profissionais envolvidos na investigação da fonte de contaminação, a bactéria estava presente em uma parte

do encanamento de uma pia próxima ao local de manipulação. Com a abertura da torneira do misturador, aerossóis podem ter sido formados e alcançado o local onde as NPs estavam armazenadas. Não há informações sobre como as cepas foram identificadas e nem se a bactéria foi isolada da corrente sanguínea dos pacientes.

Um surto de *E. cloacae*, verificado no Hospital da Mulher da Universidade Federal de Campinas em junho de 1995, acometeu 11 neonatos que foram hospitalizados na unidade de alto risco (TRESOLDI *et al.*, 2000). A bactéria foi isolada de NP e de hemocultura. Foram coletadas amostras de todos os fluidos intravenosos utilizados no hospital, apresentando resultado negativo para presença de crescimento microbiano. Foi realizada a técnica *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) para verificação do perfil genômico das cepas, observando-se que as cepas da NP e hemocultura possuíam o mesmo perfil, confirmando o surto devido a esse produto. Porém, a fonte de contaminação não foi elucidada, sendo possivelmente intrínseca ou durante a manipulação.

Em março de 1997, em um hospital em Campinas, ocorreu um surto envolvendo 49 pacientes, entre adultos e neonatos (GONÇALVES *et al.*, 2000). Os micro-organismos cepas foram identificadas por bioquímica convencional como *E. cloacae* e *E. agglomerans*. Foram realizados também teste de sorotipificação, teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e o *ribotyping*. As cepas da hemocultura e da NP apresentaram similaridade genotípicas e nas provas bioquímicas. A fonte de contaminação foi considerada intrínseca. Os autores consideraram algumas cepas isoladas como *E. agglomerans* apesar de algumas características fenotípicas divergirem.

Aragao *et al* (2001) relataram um surto de fungemia por *P. anomala* com 11 casos em crianças, sendo oito na UTI de alto risco. Ocorreu entre fevereiro e abril de 1998, no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Para a investigação foi realizado um estudo de coorte. Foram obtidas amostras de esfregaços dos profissionais de saúde da UTI e de NP. O uso de NP foi associado à fungemia por *P. anomala* nos neonatos e o uso prolongado da terapia e de emulsão lipídicas foram considerados fatores significativos para o desenvolvimento da infecção. A NP foi preparada corretamente, porém, outros componentes foram adicionados à bolsa de NP antes da administração. A tipificação molecular por PFGE indicou três diferentes clones do fungo em questão. Os resultados indicaram que o surto foi relacionado à fonte exógena e ao uso de NP e cateter. Não foi descrito pelos autores como o micro-organismo foi identificado.

Ocorreu em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) pediátrica, entre outubro de 2001 e abril de 2002, em Paris, um surto de *B. cepacia* (DOIT *et al*, 2004). Acometeu sete

pacientes, que apresentaram sinais biológicos de sepse, e seis deles apresentaram sinais de choque séptico. Foi feita uma investigação ambiental e epidemiológica em amostras de água, superfície, NP e outras soluções intravenosas administradas. As cepas foram identificadas por provas bioquímicas em sistema Índice de Perfil Analítico (API). Para verificar a relação entre as cepas clínicas e ambientais, foi realizado um *ribotyping*. Não foram encontradas cepas ambientais.

Apesar da NP manipulada estar estéril, a emulsão lipídica, manipulada diversas vezes para diferentes pacientes, foi contaminada pela água de condensação presente na rolha de fechamento do frasco. O fabricante foi informado do problema e realizou análise nas garrafas armazenadas após a autoclavação. A bactéria *B. cepacia* foi isolada da rolha de um dos frascos e também na água de arrefecimento e residual dentro da autoclave após o ciclo. Todas as cepas clínicas, as obtidas nas rolhas de vedação e a cepa isolada na indústria, pertencem ao mesmo ribotipo.

A água usada para o resfriamento após a autoclavação foi contaminada devido a um vazamento na válvula da autoclave. O micro-organismo foi introduzido na emulsão lipídica no momento em que a rolha foi perfurada pela agulha para retirada do volume desejado para cada paciente. Como um neonato requer pequenos volumes, um único frasco de emulsão lipídica foi utilizado para diversos pacientes. A garrafa foi manipulada durante uma mesma sessão de manipulação em cabine de fluxo unidirecional. O tempo de infusão prolongado (18 a 20 horas) contribuiu para a ocorrência do surto.

Os casos de infecção hospitalar diagnosticados em oito neonatos, relacionados ao surto em um hospital de ensino em Kota Bharu, na Malásia, tiveram seu início em janeiro de 2004 (HABSAH et al, 2005; VAN ROSTENBERGHE et al., 2006). Ocorreu na UTIN e sete pacientes foram a óbito. Todos desenvolveram pneumonia grave com insuficiência respiratória, choque séptico, tendência a sangramento, perfil anormal de coagulação e trombocitopenia. Em todas as hemoculturas houve crescimento de *Pantoea* spp., que foi identificada por provas bioquímicas convencionais, chegando-se à família Enterobacteriaceae, e por API, chegando-se a um percentual de 40,7% para *P. agglomerans*. Todas as cepas apresentaram perfil semelhante de provas bioquímicas e padrão de susceptibilidade (resistência apenas à ampicilina). Também foi isolada da NP não utilizada a bactéria *Pantoea* spp., semelhante fenotipicamente às cepas da hemocultura. Em um único paciente, a bactéria *Pantoea* spp. também foi isolada de líquido cefalorraquidiano.

No estudo de Van Rostenberghe et al. (2006), os autores relataram que, no caso de infecções sistêmicas causadas por *Pantoea* spp., as cepas têm preferência pelos pulmões como

sítio de infecção. A gravidade dos sintomas desenvolvidos pelos neonatos pode estar relacionada à virulência dessas cepas e também pela carga microbiana da bactéria presente na bolsa de NP. Apesar do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstrar que as cepas eram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados, o tratamento com tais fármacos não foi eficaz, sugerindo que houvesse uma diferença entre a sensibilidade *in vitro* e *in vivo*.

A farmácia adotava uma prática de preparar semanalmente uma solução estoque contendo dextrose, cálcio e vitaminas solúveis em água, que era utilizada como base para diversas NP. A esterilidade dessa solução foi negativa utilizando-se o método padronizado da farmácia, que consistia na inoculação de 1 mL em TSB e 1 mL em caldo BHI. O método para verificação da esterilidade foi revisado, incubando-se a bolsa total e prosseguindo com os repiques assim como de todos os insumos envolvidos no preparo da NP. Segundo os autores, as alíquotas repetidas dessa solução estoque podem ter sido a fonte de contaminação (HABSAH *et al.*, 2005).

A verificação da esterilidade foi feita nos insumos envolvidos no preparo das NPs. Foram coletadas amostras ambientais da UTIN e na farmácia, incluindo o desinfetante e a cabine de fluxo unidirecional. Todas as amostras ambientais foram negativas para *Pantoea* spp.. Os autores não utilizaram metodologia molecular para confirmação da identificação e nem para verificar a relação clonal das cepas.

As infecções nosocomiais em neonatos, relatadas por Vegas et al (2006), foram identificadas entre maio de 1998 e abril de 1999, em Mérida, na Venezuela. Foi obtido um total de 28 cepas, sendo 25 de pacientes, dois de NP e um do aparelho de umidificação. Dessas cepas, 21 foram identificados como *A. baumannii* e quatro como *Acinetobacter* spp.. Os pacientes desenvolveram sepse, meningite e infecção de ferida. As cepas foram identificadas por testes fenotípicos e sequenciamento do gene *rrs* (ácido ribonucleico ribossomal). Além disso, foi realizada reação em cadeia da polimerase de elementos palindrômicos extragênicos repetitivos (REP-PCR) e PFGE. As cepas contaminantes das NPs e da hemocultura foram clonais. Os insumos utilizados no preparo das NPs foram analisados, não sendo encontrada nenhuma contaminação. Os autores afirmaram que a contaminação ocorreu durante a manipulação do produto na farmácia do próprio hospital.

Entre 28 de abril e 05 de maio de 2004, seis hospitais, sendo cinco na cidade do Rio de Janeiro e um em Niterói, relataram que 19 hemoculturas de neonatos prematuros foram positivas para *E. hormaechei* (CAMPOS *et al.*, 2007). Alíquotas das NPs utilizadas pelos pacientes foram analisadas, verificando-se a presença da mesma bactéria. A identificação foi feita usando o equipamento VITEK®2 Compact e sistema API. A tipificação molecular por

PFGE revelou que as cepas da hemocultura e das NPs se tratavam do mesmo clone. O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou que todas as cepas eram resistentes à cefalotina, cefoxitina, amicacina, tetraciclina e ciprofloxacina.

Em um hospital em Corunha, na Espanha, ocorreram surtos divididos em dois períodos: entre julho de 2003 e outubro de 2004, e entre agosto e novembro de 2006, totalizando 48 pacientes, distribuídos em 13 diferentes departamentos (BOU *et al.*, 2008). A bactéria *L. mesenteroides* foi identificada usando provas fenotípicas. O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos mostrou que as cepas eram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. A tipificação molecular revelou que as cepas de *L. mesenteroides* do primeiro surto não pertenciam ao mesmo clone do segundo surto. No segundo surto, essa bactéria foi isolada de hemocultura e também de cateter usado para a infusão da NP. Amostras ambientais e de pele foram negativas para essa bactéria. Considerando que os pacientes fizeram uso de NP e que estavam localizados em pavimentos diferentes do hospital, a NP foi apontada como a fonte de contaminação, mesmo que nenhuma bactéria tenha sido isolada desse produto. Os autores não informaram se a NP foi analisada.

Entre 10 e 12 de dezembro de 2005, sete neonatos prematuros apresentaram febre em um hospital universitário em Selçuk, na Turquia (ARSLAN *et al.*, 2010). Todos esses pacientes desenvolveram sepse. A hemocultura revelou presença de uma bactéria, que foi identificada, usando o sistema API, como *S. marcescens*. Todas as amostras ambientais foram negativas para essa bactéria. Entretanto, *S. marcescens* foi isolada de três bolsas de NP. A tipificação molecular revelou que as cepas de hemocultura e da NP apresentaram o mesmo perfil de bandas de fragmento de DNA. No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, as cepas de *S. marcescens* foram sensíveis a todos os antimicrobianos, com exceção da ampicilina.

Outros dois surtos causados por *S. marcescens* ocorreram entre dezembro de 2007 e fevereiro de 2010 no Hospital Geral de Alexandria, no sul da Grécia, envolvendo 15 neonatos (MALTEZOU *et al.*, 2012). Foram coletadas amostras ambientais, dos profissionais de saúde envolvidos, antissépticos, de fórmulas de leite e de NP. A bactéria *S. marcescens* foi isolada de hemocultura e do dreno da pia que estava envolvida no preparo da NP e das fórmulas de leite, mas nenhum micro-organismo foi isolado desses produtos.

A via de contaminação não foi elucidada. Maltezou *et al.* (2012) consideraram o uso de NP como o único fator de risco significativo estatisticamente relacionado aos casos de bacteremia por *S. marcescens*. Foram observados procedimentos incorretos durante a manipulação da NP, tanto de higiene de mãos, quanto do ambiente no qual a solução era

preparada. A técnica de PFGE foi utilizada para verificar a relação genética entre as cepas do dreno da pia e os da hemocultura, que possuíram relação clonal.

Nos Estados Unidos, o Departamento de Saúde Pública do Alabama foi notificado no dia 16 de março de 2011 sobre um surto de bacteremia por *S. marcescens* que havia ocorrido em dois hospitais do Alabama (SACKS, 2011). Após uma investigação, foi visto que o surto teve início no mês de janeiro (um caso) e ocorreu em seis hospitais diferentes, acometendo 19 pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 38 e 94 anos. A NP de uma mesma farmácia de manipulação era o produto em comum usado por todos os pacientes. Os casos de bacteremia ocorreram em 35% dos pacientes que receberam a NP.

A bactéria *S. marcescens* foi isolada da torneira de água que era utilizada para exaguar equipamentos de envase. Foi verificado que as cepas de *S. marcescens* de sangue dos pacientes e torneira de água correspondiam ao mesmo clone. De acordo com os autores, possivelmente, falhas no processo de esterilização desses equipamentos foram apontadas como responsáveis pelo surto.

Um surto causado por *B. cereus* ocorreu em diversas cidades da Inglaterra, no final de maio de 2014, acometendo pacientes de 11 hospitais diferentes (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2014). Foram 23 casos de sepse em neonatos, com três óbitos. As cepas de *B. cereus* da hemocultura apresentaram a mesma clonalidade com as cepas da NP, de insumos utilizados na formulação desse produto e da área estéril de produção.

Na cidade de Chambéry (França), em dezembro de 2013, quatro bebês foram acometidos com choque séptico (LE FLÈCHE-MATÉOS *et al.*, 2015). Todos os bebês foram a óbito e fizeram uso de NP fornecida pela mesma empresa (CABUT, 2015). Os autores informaram apenas que a bactéria *R. chamberiensis* foi isolada de seis diferentes bolsas de NP. Eles não relataram se isolaram a mesma bactéria na hemocultura dos pacientes, mas mencionaram que essa espécie bacteriana possui um crescimento latente a 37°C. Os autores realizaram diversas técnicas de identificação, incluindo o sistema VITEK®, Espectrofotometria de Massa em MALDI-TOF e *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA). Com essa abordagem polifásica de identificação, foi verificado que a bactéria pertencia a um novo gênero. Essa espécie bacteriana foi sensível aos 39 antimicrobianos testados.

Na clínica de neonatologia de um hospital de pesquisa em Esmirna, na Turquia, 20 neonatos receberam NP. Deste total, 13 pacientes desenvolveram sepse e foram a óbito em um período de 18 horas, mesmo sendo submetidos ao tratamento com meropenem e vancomicina (KÔSE *et al.*, 2016). A bactéria *E. cloacae* foi identificada em cinco hemoculturas e em 11 amostras de NP. As soluções de glicose e de aminoácidos também estavam contaminadas com

essa bactéria. Os autores não mencionaram qual o método de identificação foi utilizado. A genotipificação foi executada para demonstrar que as cepas correspondiam a um mesmo clone, confirmando que o surto foi originado pelo uso de NP contaminada. Entretanto, a fonte de contaminação não foi elucidada.

Um surto causado por *C. albicans* ocorreu em 2015 em um hospital universitário na Turquia e acometeu sete recém-nascidos da Unidade de Cuidados Intensivos Pediátrica (UCIP) (GUDUCUOGLU *et al.*, 2016). Foram coletadas 96 amostras de cultura para vigilância, incluindo NP, hemocultura, reto e pele dos pacientes, de superfícies da UCIP e de profissionais da saúde. Os micro-organismos provenientes das amostras que tiveram crescimento positivo foram identificados pelo sistema automatizado *kit ID 32C™ Fungus 3*, dentre eles, o fungo *C. albicans*. A relação genética e clonal entre as cepas isoladas da hemocultura e as cepas das amostras de vigilância foi feita através de reação em cadeia da polimerase com primer arbitrário (AP-PCR), REP-PCR e PFGE. Foi confirmada a causa do surto devido a administração de NPs contaminadas, que foram preparadas manualmente na farmácia.

O surto causado por *P. diazotrophicus*, *R. radiobacter* e *A. baumannii* ocorreu entre novembro de 2013 e junho de 2014 em quatro estados do Brasil, envolvendo 15 hospitais, totalizando 56 casos de bacteremia e 15 óbitos, sendo o primeiro caso notificado em Curitiba (Paraná, PR) (PILLONETTO *et al.*, 2018). Entre os pacientes, 22 tinham menos de 1 ano de idade, enquanto os restantes eram mais velhos (variação: 4 a 74 anos). As NPs provenientes do estado de Minas Gerais foram manipuladas por uma empresa diferente da do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo. No Rio Grande do Sul, as NPs foram manipuladas por uma farmácia interna do hospital. O insumo gluconato de cálcio foi investigado por ser um produto em comum entre as duas farmácias de manipulação envolvidas, que foram fechadas pela Anvisa durante três meses, como medida cautelar.

No total, foram obtidas 73 cepas, sendo 45 de sangue, 25 de NP e três do gluconato de cálcio, que foram identificados por métodos fenotípicos, sequenciamento do gene *rrs* e MLSA. As cepas de hemocultura e NP das espécies *P. diazotrophicus* e *A. baumannii* demonstraram ser clonais, enquanto as cepas de *R. radiobacter* da NP, hemocultura e gluconato de cálcio não foram considerados relacionados.

Além dos surtos relatados em periódicos, Austin (2016) e Lewis (2017) citam óbitos ocorridos devido à NP contaminada: 13 neonatos foram a óbito devido à bactéria *Serratia* spp. em Joanesburgo (África do Sul), em 1990; seis óbitos de neonatos relacionados à

contaminação de NP pela bactéria *E. cloacae*, em Bloemfontein (África do Sul), em 2004; e três óbitos em Mainz (Alemanha), em 2010.

1.6 Família enterobacteriaceae

As enterobactérias vêm sendo relacionadas frequentemente a surtos de infecção hospitalar causados por NP contaminada. Essas bactérias constituem a maior família dentro da ordem Enterobacteriales, compreendendo aproximadamente 59 gêneros e 250 espécies válidas (OCTAVIA; LAN, 2014; PARTE, 2018), estando amplamente distribuídas no ambiente e sendo encontradas na água, solo, vegetais e no intestino humano (WINN *et al.*, 2012; ADEOUT *et al.*, 2016; ALNAJAR; GUPTA, 2017). De acordo com Adeolu *et al.* (2016), é uma das famílias de espécies bacterianas válidas que possui maior diversidade taxonômica. A família Enterobacteriaceae é formada por bacilos Gram negativos, a maioria móvel e não esporula (FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015). São anaeróbios facultativos, crescendo tanto na presença quanto na ausência de oxigênio; possuem temperatura de crescimento entre 22 e 35°C e toleram a faixa de pH entre 4 e 8. Realizam metabolismo fermentativo e oxidativo, sendo considerados quimiorganotróficos. Fermentam D-glicose, formando compostos ácidos e com produção de gás (BRENNER; FARMER, 2005). Não são halofílicos, se desenvolvendo em concentrações de sais que variam entre 0 a 5% (FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015). A maioria é oxidase negativa, catalase positiva e reduz nitrato a nitrito (BRENNER; FARMER, 2005).

Esse grupo de bactérias, relacionadas bioquimicamente e geneticamente entre si, demonstra diferente relação com a sua ecologia, tipo de hospedeiro e virulência, podendo causar doença no homem, animais, plantas e insetos (BRENNER; FARMER, 2005; ADEOLU *et al.*, 2016). Muitos membros dessa família são bactérias comensais, fazendo parte da microbiota normal do homem. Porém, em indivíduos imunocomprometidos, as cepas comensais e ambientais podem causar infecções graves, sendo isoladas de diversos sítios do organismo humano (WINN *et al.*, 2012).

Com o desenvolvimento de novas técnicas para o estudo da sistemática de microorganismos, ocorreu um aumento na descrição de novos gêneros e espécies bacterianas que se enquadram na família das enterobactérias (WINN *et al.*, 2012). A grande variabilidade bioquímica e a inclusão crescente de novas espécies têm tornado difícil a descrição dessa família (BRENNER; FARMER, 2005), pois a distinção de suas espécies foi baseada em análises bioquímicas e na similaridade da sequência de nucleodídeos, obtida pelo

sequenciamento do gene que codifica o 16S RNA ribossomal (gene *rrs*). Atualmente, para correção de problemas taxonômicos da família Enterobacteriaceae, metodologia com abordagem polifásica vem sendo muito utilizada. A taxonomia polifásica engloba métodos de caracterização fenotípica, incluindo análises proteômicas, e genotípica, que abrange técnica de hibridação DNA-DNA, MLSA, identidade média de nucleotídeos e análise do genoma completo (FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015; HATA *et al.*, 2016; ALNAJAR; GUPTA, 2017). Esses problemas taxonômicos não ocorrem apenas nessa família, mas ficam em maior evidência devido à importância clínica das enterobactérias (FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015).

Quanto às características de susceptibilidade aos antimicrobianos dos membros dessa família, tem sido observado um crescente número de cepas resistentes a diversos antimicrobianos (FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015). Por isso, se torna importante a execução do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de enterobactérias isoladas.

1.7 Família Rhizobiaceae

Rhizobiaceae é uma família que pertence à ordem Rhizobiales e classe de Alphaproteobacteria, apresentando gêneros bacterianos que são colonizadores de solo e planta. As bactérias dessa família apresentam perfis fenotípicos heterogêneos, tendo a sua taxonomia baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene *rrs*. É formada por 11 gêneros válidos (PARTE, 2018), sendo *Rhizobium* o gênero tipo (ALVES, *et al.*, 2014).

A bactéria *Rhizobium radiobacter* foi descrita pela primeira vez por Conn (1946) como *Agrobacterium radiobacter*. A nova combinação do epíteto *radiobacter* foi descrita em 2001 por Young *et al.* com base em análises do sequenciamento do gene *rrs* (PARTE, 2018). Esse micro-organismo é um bacilo Gram negativo, aeróbio, móvel, oxidase-positivo, que não forma esporos (WINN *et al.*, 2012). Por se tratar de um fitopatógeno encontrado principalmente no solo, é considerado um patógeno humano oportunista, causando infecções em indivíduos com a imunidade comprometida (LAI *et al.*, 2004). *R. radiobacter* é a espécie, pertencente ao gênero *Rhizobium*, de maior importância clínica. Sua infecção no organismo humano tem sido relacionada frequentemente ao uso de cateter (POTVLIEGE; VANHUYNEGEM; HANSEN, 1989; RODBY; GLICK, 1991; EDMOND *et al.*, 1993; LAI *et al.*, 2004) e próteses biomédicas (DUNNE; TILLMAN; MURRAY, 1993). Essa característica pode ser atribuída a uma possível capacidade dessa bactéria em se aderir a superfícies de silicone (MARTA *et al.*, 2011).

R. rabiobacter tem temperatura ótima de crescimento entre 25 e 28°C, crescendo também a 35°C (WINN *et al.*, 2012; VANEECHOUTTE *et al.*, 2015), logo é capaz de se desenvolver no organismo humano (DUNNE; TILLMAN; MURRAY, 1993). Produz fenilalanina desaminase e hidrolisa ureia e esculina. Não fermenta glicose, mas é capaz de assimilá-la. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pode variar, devendo ser testado em cada cepa (DUNNE; TILLMAN; MURRAY, 1993; WINN *et al.*, 2012; VANEECHOUTTE *et al.*, 2015).

1.8 Métodos de identificação de micro-organismos

A capacidade de se avaliar aspectos patogênicos de uma bactéria depende, em grande parte, da sua correta identificação, da relação com outros membros próximos a sua espécie e suas contribuições relativas à composição geral do ecossistema. Assim, é possível conhecer como o micro-organismo pode afetar a saúde de seu hospedeiro (FRANK *et al.*, 2008). Logo, a identificação exata de bactérias patogênicas é essencial para escolha da terapia, pós-tratamento, fins epidemiológicos e estabelecimento de estratégias específicas de uso e controle de antimicrobianos (BARGHOUTH, 2011; SRINIVASAN *et al.*, 2015). Atualmente, um dos principais desafios para a prática clínica e vigilância da saúde pública é a identificação rápida e precisa de agentes infecciosos, pois é o primeiro passo na redução das doenças infecciosas (SRINIVASAN *et al.*, 2015).

No caso de controle de qualidade, a identificação de micro-organismos é útil, principalmente, em processos assépticos de fabricação, sendo necessária quando ocorrem testes de esterilidade positivos e presença de contaminação em simulações de processo asséptico, como por exemplo, o *media fill* (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016). A identificação do micro-organismo em questão fornece dados sobre a biodiversidade ambiental, permite supor possíveis fontes de contaminação (quando realizada a análise microbiológica no produto acabado e nas matérias-primas) e o risco que esse micro-organismo pode oferecer à saúde (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os métodos de identificação existentes são divididos em dois grandes grupos: fenotípicos e genotípicos. Quando esses métodos são utilizados em conjunto para a classificação sistemática de micro-organismos, se tem uma abordagem polifásica. A sistemática em bacteriologia abrange a taxonomia, a filogenia e ecologia. A abordagem polifásica tem sido muito utilizada para classificação e reclassificação de espécies bacterianas que eram realizadas com base poucas metodologias (PRAKASH *et al.*, 2007). É fundamental

que os métodos de identificação sejam realizados em comparação com uma cepa tipo, que já possui suas características estabelecidas, e que todos sejam iniciados a partir de culturas puras obtidas pela técnica de esgotamento (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016).

1.8.1 Métodos fenotípicos

Os métodos fenotípicos utilizam os produtos da expressão gênica para distinguir diferentes micro-organismos, requerendo um grande número de células em culturas puras. (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016; COSTA, 2014). São testes clássicos utilizados na rotina de um laboratório. Englobam a realização de cultivo do micro-organismo, verificação da sua temperatura ótima de crescimento, descrição da morfologia da célula e da colônia, coloração de Gram, fisiologia (tipo de meio de cultura e nutrientes, pH), realização de provas bioquímicas convencionais, quimiotaxonômicas e testes imunológicos. Além desses citados, existem equipamentos automatizados para a realização dos testes fenotípicos, como por exemplo, VITEK® e API, que são sistemas para execução de diversas provas bioquímicas simultaneamente.

Os métodos convencionais, de forma geral, possuem menor custo, entretanto, possuem limitações. Eles nem sempre são suficientes para identificar corretamente micro-organismos. Isso porque existem espécies bacterianas diferentes que possuem perfil fenotípico muito semelhante. Em paralelo, micro-organismos estressados e recentemente isolados podem não expressar plenamente suas características fenotípicas, podendo comprometer a identificação por esse tipo de método (COSTA, 2014). A expressão do fenótipo microbiano pode ser afetada pelo tipo de meio de cultura usado, pelas condições de crescimento (pH, temperatura e tempo de incubação) e também pelo ambiente onde foi isolado. Outra limitação dos métodos fenotípicos está no período de incubação necessário para recuperação e crescimento do micro-organismo, visto que cepas ambientais podem não crescer em meios de culturas gerais (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016).

Para a execução dos métodos fenotípicos é de extrema importância a utilização de cepas de referência como controle positivo e negativo para cada prova utilizada, a fim de se evitar falso-positivos e falso-negativos durante a leitura.

1.8.1.1 Métodos proteômicos

Os métodos baseados na proteômica correspondem ao estudo e caracterização do

conjunto de proteínas expresso pelo genoma da bactéria (proteoma) (BOU *et al.*, 2011). A técnica do *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight – Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) é um exemplo de análise de proteínas. O princípio geral da espectrofotometria de massa é produzir, separar e detectar íons de fase gasosa (JURINKE; OETH; VAN DEN BOOM, 2004). Nessa técnica, a biomolécula é ionizada por dessorção a laser assistida por uma matriz, sendo detectada por um espectrômetro de massa em uma câmara a vácuo, onde seu tempo de voo é atribuído por um analisador (equipamento). A dessorção permite a passagem da biomolécula do estado sólido para o gasoso. A razão massa/carga (m/z) de cada molécula irá influenciar no seu tempo de chegada ao detector no tubo a vácuo, gerando uma leitura em forma de pico para cada molécula detectada (GOULART; RESENDE, 2013).

A técnica de MALDI-TOF MS tem a sua reprodutibilidade baseada na análise de proteínas ribossomais, proteínas de ligação ao DNA e proteínas de choque frio (RYZHOV; FENSELAU, 2001). Por ser considerada um método fenotípico, o seu resultado também é influenciado pela expressão de proteínas.

1.8.2 Métodos genotípicos

Os métodos genotípicos estão relacionados ao estudo do genoma dos micro-organismos. Esses métodos são capazes de identificar com alta sensibilidade um grande número de patógenos, inclusive a partir de amostras clínicas sem a necessidade de um cultivo prévio, sendo útil para investigar epidemias e identificar cepas clínicas incomuns (KOO *et al.*, 2006; SRINIVASAN *et al.*, 2015). São realizados de forma mais rápida, porém requerem um elevado custo para sua execução e profissionais especializados. São muito aplicados quando: a bactéria é de difícil cultivo ou não está viável; caso em que o meio de cultura tem elevado custo; as provas bioquímicas convencionais não são suficientes para obter a identificação final; ou quando se trata de uma nova espécie.

Outra vantagem dos métodos genotípicos é que não necessitam que o micro-organismo esteja viável para ser executado (BOU *et al.*, 2011). No contexto de síndromes clínicas, como sepsis, a presença de um agente patogênico é, muitas vezes, pouco esclarecida, uma vez que diversas bactérias são de difícil cultivo, o que ocorre em mais de 50% dos casos (MARTIN *et al.*, 2003).

São exemplos de métodos genotípicos: pesquisa de genes específicos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos, sequenciamento do gene que

codifica o 16S RNA ribossomal, hibridação DNA-DNA, MLSA e assinaturas genômicas (identidade média de nucleotídeos).

A hibridação DNA-DNA foi adotada como o principal método de delineamento de espécies bacterianas, no qual um percentual de similaridade entre duas cepas menor do que 70% indicaria que ambas não corresponderiam a uma mesma espécie bacteriana. Porém, algumas espécies de micro-organismos podem ter esse percentual mais elevado. Esse valor foi estabelecido com base em um percentual de similaridade menor do que 97% para sequências do gene *rrs* de diferentes espécies (FOX *et al.*, 1992; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; ADÉKAMBI *et al.*, 2008). Em outro estudo o percentual limite de similaridade do gene *rrs* entre espécies variou de 98,7 a 99% e os autores observaram que, mesmo em espécies que compartilhavam uma similaridade maior que 99% na sequência do gene *rrs*, o percentual na técnica de hibridação se mantinha menor do que 70% (STACKEBRANDT; EBERS, 2006; ADÉKAMBI *et al.*, 2008), demonstrando ser um método robusto para aplicação na taxonomia bacteriana.

1.8.2.1 Sequenciamento de genes

Os métodos de amplificação e sequenciamento de genes foram introduzidos na década de 1980, sendo um marco importante na taxonomia bacteriana (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2007; BEYE *et al.*, 2018). O estudo do gene *rrs* é um dos primeiros passos nos esquemas de identificação de procariotos (GARRITY, 2016), fornecendo dados filogenéticos de uma comunidade microbiana (LANE *et al.*, 1985). Esse marcador filogenético é um gene universal de aproximadamente 1.500 pb que codifica um RNA (ácido ribonucleico) que faz parte da unidade 30S do ribossomo. Ele está presente em todas as bactérias e possui regiões de sequências conservadas e variáveis, permitindo o estabelecimento de relação entre gêneros e, às vezes, espécies (SRINIVASAN *et al.*, 2015). Ele é um gene altamente conservado, sendo composto por nove domínios hipervariáveis que são separados por fragmentos mais preservados, que podem ser utilizados para o desenho de iniciadores universais (BEYE *et al.*, 2018).

Essa técnica utiliza a PCR como base, seguida do sequenciamento dos fragmentos amplificados. No método por Sanger, mais de um iniciador é utilizado a fim de possibilitar o sequenciamento quase completo desse gene em diversos gêneros bacterianos. Esse método permite o estudo filogenético de bactérias patogênicas e de crescimento exigente sem a necessidade de cultivá-las (WEISBURG *et al.*, 1991). Quando aplicado em conjunto a um

banco de dados, possibilita a identificação de espécies ou gêneros bacterianos pelo alinhamento com sequências do gene *rrs* de espécies de bactérias depositadas nos mesmos.

Apesar de ser uma técnica de primeira escolha na identificação molecular da maioria das bactérias, o sequenciamento e análise do gene *rrs* possui limitações. Esse gene pode possuir diversas cópias dentro de um único genoma, principalmente nas bactérias pertencentes à classe Gammaproteobacteria, e espécies de um mesmo gênero podem apresentar sequências quase idênticas desse fragmento (VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013).

A comparação entre sequências totais do gene *rrs* gera uma porcentagem de similaridade entre espécies, sendo 98,65% o valor para diferenciar duas espécies (KIM et al, 2014). Porém, para alguns gêneros, esse referencial é baixo, não discriminando espécies que compartilham uma similaridade acima de 99% na sequência do gene *rrs*, sendo necessária a aborgem de outras técnicas, como por exemplo, assinaturas genômicas e MLSA (ROSSI-TAMISIER *et al.*, 2015).

A análise do gene *rrs* frequentemente não é capaz de diferenciar espécies correspondentes a um mesmo gênero, sendo necessário o sequenciamento de outros genes *housekeeping*. Esses genes são considerados conservados, possuem baixa pressão de seleção e codificam proteínas que atuam em funções vitais da célula (CHRISTENSEN *et al.*, 2004; GLAESER; KÄMPFER, 2015), como por exemplo, os genes *atpD* (subunidade beta da enzima ATP sintase), *gyrB* (subunidade beta da enzima girase), *infB* (fator de iniciação da tradução IF-2) e *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase).

O sequenciamento de genes *housekeeping* vem sendo muito utilizado para a identificação e tipificação de bactérias. Com a aplicação dessa técnica, foi elaborado o método MLSA, que permite uma maior resolução filogenética entre espécies de um mesmo gênero ou pertencentes a uma mesma família. A análise é feita por meio de uma árvore filogenética de sequências concatenadas de múltiplos genes com fragmentos internos sequenciados (GLAESER; KÄMPFER, 2015). As árvores concatenadas refletem uma relação entre as espécies mais próxima à realidade. Devido a isso, essas árvores filogenéticas podem ser consideradas uma ferramenta paralela a hibridação DNA-DNA (SCHLEIFER, 2009), que é uma técnica trabalhosa, requer que a bactéria seja cultivada e não permite que uma única cepa seja comparada com um banco de dados. Desse modo, o sequenciamento de genes vem sendo utilizado como uma possível alternativa à hibridação DNA-DNA (ADÉKAMBI *et al.*, 2008).

O termo MLSA foi introduzido por Gevers et al em 2005, que sugeriram o uso de genes presentes em todos os táxons do estudo e com uma única cópia no genoma, evitando-se genes que, quando recombinados, tenham uma vantagem seletiva. Ele foi baseado nos

princípios utilizados pelo *multilocus sequence typing* (MLST), introduzido por Maiden et al em 1998 (GLAESER; KÄMPFER, 2015).

A família Enterbacteriaceae teve a sua classificação baseada na patogenicidade das espécies e também na sequência do gene *rrs* (HATA *et al.*, 2016). Porém, estudos demonstraram que espécies de enterobactérias possuem sequências desse gene intimamente relacionadas entre si, resultando em diversos problemas taxonômicos de classificação (ADEOLU *et al.*, 2016).

Diante dessas incertezas taxonômicas, diversos trabalhos, com base no método MLSA, foram realizados a fim de esclarecer a posição filogenética das espécies de enterobactérias, incluindo a descrição de novos gêneros e espécies (BRADY *et al.*, 2013; GLAESER; KÄMPFER, 2015; HATA *et al.*, 2016). No estudo de Adeolu *et al.* (2016), os pesquisadores também utilizaram a técnica MLSA e estudo do genoma total para propor a divisão da família Enterobacteriaceae em sete distintos clados, dividindo a ordem Enterobacterales em sete famílias diferentes.

1.9 Resistência aos antimicrobianos

A detecção de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos em laboratórios é um passo crítico necessário para a terapia adequada para os pacientes e esforços de prevenção e controle de infecção (FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015). Segundo Uniciuc et al (2018), “a vigilância da resistência antimicrobiana é um passo fundamental nos esquemas de avaliação de risco”.

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos é indicado para qualquer bactéria que esteja causando algum processo infeccioso que necessite ser combatido com antimicrobianos (CLSI, 2018). Além disso, o ensaio é importante também quando a indicação do antimicrobiano não seja confiável com base na sua identificação, uma vez que algumas espécies possuem resistência intrínseca a determinado antimicrobiano (FRIGATTO; FERNANDES; VAZ, 2008; BLAIR *et al.*, 2015; ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017). O Quadro 3 mostra alguns exemplos de espécies de enterobactérias que possuem resistência intrínseca a alguns antimicrobianos.

Quadro 3 - Resistência intrínseca aos antimicrobianos apresentada por micro-organismos pertencentes à família Enterobacteriaceae.

Gênero ou Espécie	Resistência aos Antimicrobianos
Diversos gêneros	Ácido fusídico, clindamicina, estreptograminas, glicopeptídeos, linezolida, macrolídeos, mupirocin e penicilina G.
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>E. cloacae</i> e <i>Klebsiella aerogenes</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefoxitina, cefotetan e cefuroxima.
<i>Citrobacter koseri</i>	Ampicilina e cefalotina
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Ampicilina
<i>S. marcescens</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefoxitina, colistina e cefuroxima.
<i>Proteus mirabilis</i>	Polimixina, colistina, nitrofurantoína e tetraciclina.
<i>Proteus vulgaris</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefoxitina, cefuroxima, colistina e nitrofurantoína.
<i>Morganella morganii</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefuroxima, nitrofurantoína e colistina.
<i>Providencia</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefuroxima, gentamicina, tobramicina, polimixina, nitrofurantoína e colistina.
<i>Providencia stuartii</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, gentamicina, polimixina, nitrofurantoína e colistina.
<i>Providencia rettgeri</i>	Ampicilina, cefalotina, tetraciclina, nitrofurantoína, polimixina e colistina.
<i>Salmonella</i> spp.	Cefalosporina de primeira e segunda geração, cefuroxima e aminoglicosídeos.

Legenda: S.: *Serratia*.

Fonte: (FRIGATTO; FERNANDES; VAZ, 2008).

Algumas infecções são causadas por micro-organismos de difícil identificação rotineira, ou seja, para sua correta caracterização, são necessários métodos e materiais que muitos laboratórios clínicos não dispõem para análise. Nesses casos onde não se chega à identificação correta da espécie bacteriana, o teste de susceptibilidade se torna fundamental para direcionar a terapia com antimicrobianos. Além disso, esse tipo de teste é indicado para

casos onde há suspeita de que o patógeno é resistente aos antimicrobianos usados na rotina hospitalar ou quando há necessidade de troca da terapia devido a reações adversas. O principal objetivo desse ensaio é direcionar a terapia (TURNIDGE, 2015).

Para a análise da susceptibilidade de bactérias aos antimicrobianos, podem ser adotados diversos métodos: microdiluição em caldo, difusão em disco (MDD) e métodos automatizados, que são utilizados para bactérias aeróbias ou aneróbias facultativas. O MDD é o que tem seu uso mais difundido devido a sua flexibilidade na seleção dos antimicrobianos, sua capacidade de responder rapidamente à introdução de novas terapias e seu baixo custo (TURNIDGE, 2015).

A presença de micro-organismos contaminantes e resistentes aos antimicrobianos em um produto intravenoso, como NP, aumenta o potencial de risco inerente à TNP, podendo levar a dificuldades no tratamento de um paciente que foi acometido por uma infecção relacionada a tal produto.

1.10 Justificativa

Após a implementação da NP no meio hospitalar e o estabelecimento de diretrizes para a sua produção, o risco microbiológico, associado com a sua manipulação, foi reduzido, mas não extinto. Mesmo que a probabilidade de contaminação da NP seja baixa quando são utilizadas normas adequadas de controle, ela ainda ocorre, sendo um fator crítico que deve ser monitorado (ALLWOOD, 1997). Turpin et al (2011) relataram em sua pesquisa que a cada 20 NP que são manipuladas, uma é contaminada (5%). Outros estudos relataram uma alta taxa de infecção sanguínea associada ao uso de NP, variando de 1,3 a 39% (DISSANAIKE *et al.*, 2007; OPILLA, 2008).

Elevadas taxas de bacteremias, originadas pelo uso de NPs contaminadas, levaram a Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral a publicar em 2009 algumas diretrizes, dentre elas a sugestão de restrição do uso da NP durante os primeiros sete dias após admissão na UTI em pacientes saudáveis e bem nutridos que não podem ser alimentados pela via enteral (MCCLAVE *et al.*, 2009; TURPIN *et al.*, 2011).

Por se tratar de uma infusão intravenosa, que geralmente é administrada em pacientes com certo grau de comprometimento imunológico, qualquer célula microbiana viável que esteja presente nas NPs poderá levar a infecções da corrente sanguínea, sepse e, até mesmo, óbito. Estudos mostram que o uso de NP aumenta o risco de infecção de corrente sanguínea em neonatos (ALLWOOD, 1997; ZINGG; TOMASKE; MARTIN, 2012). Os danos causados

por esses produtos sem qualidade geralmente são irreparáveis e levam a surtos de infecção e a óbitos em hospitais, principalmente no caso de neonatos, crianças e idosos, apresentando um elevado custo para o sistema de saúde (TURPIN *et al.*, 2011). Diante disso, é importante que ações de VISA sejam implementadas.

O principal objetivo da VISA é garantir a segurança sanitária de produtos e serviços, promovendo a defesa e proteção da saúde coletiva através do gerenciamento de risco, que é o foco de suas ações, visto que quanto menor a qualidade, maior o risco (BRASIL, 1990b). Suas ações se baseiam também nas necessidades sanitárias de acordo com o desenvolvimento do setor produtivo (O'DWYER; REIS; SILVA, 2010). Em paralelo a essa questão, visando o cumprimento de seu objetivo inicial, é imprescindível avaliar a qualidade dos produtos circulados no Brasil, fornecendo à população produtos seguros e com qualidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018).

No Brasil, existem poucos dados publicados sobre surtos ou contaminação de NP, pois é difícil estabelecer a relação de infecções adquiridas nos hospitais com a TNP (ALLWOOD, 1997), podendo levar à subnotificação dos casos ocorridos (VONBERG; GASTMEIER, 2007). Pesquisas relacionadas à contaminação de NP dão notoriedade a esse tema que é pouco abordado no país, fornecendo subsídios à Anvisa para a regulação desse produto. Por ser uma terapia de alto risco, são necessárias normas atualizadas para a prescrição, produção, controle microbiológico, transporte e administração de NP.

Além disso, como mencionado, o INCQS integra o SISLAB e compõe o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária como única instituição em nível federal, atuando como referência para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária. É papel do INCQS, desenvolver pesquisas no sentido de contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017).

Com base no exposto, foi feito um levantamento das cepas provenientes de NP para serem estudadas. Esse trabalho é importante para evidenciar a ocorrência de contaminação de NP e surtos de infecção causados por micro-organismos contaminantes desse produto no Brasil.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Identificar as cepas provenientes de nutrições parenterais contaminadas, recebidas no INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, e obter um panorama sobre os dados documentais das amostras encaminhadas ao Instituto, nesse período.

2.2 Objetivos específicos

- realizar um levantamento das amostras de NP encaminhadas ao INCQS e caracterizá-las de acordo com diferentes variáveis: modalidade de análise, motivo de apreensão, resultado do ensaio de esterilidade e do laudo analítico, forma de coleta, tempo entre a coleta e a entrada da amostra no INCQS, volume, órgão fiscalizador que realizou a apreensão, região de origem, número de amostras encaminhadas por ano, e descrição de surtos;
- analisar os processos referentes às amostras de NP e verificar os possíveis motivos que levaram a não realização de análise da qualidade das NPs;
- confirmar a identificação das cepas isoladas de NP através de métodos fenotípicos, proteômicos e genotípicos;
- determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas isoladas de NP.

3 METODOLOGIA

3.1 Levantamento de dados

3.1.1 Busca no Sistema Harpya e Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA)

Foi realizado um estudo documental e análise de corte transversal com amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, analisadas pelo Setor de Produtos Estéreis do Departamento de Microbiologia do INCQS (DM/INCQS). O período de corte foi estabelecido considerando-se os dados disponibilizados de forma informatizada.

O levantamento do total de nutrições parenterais encaminhadas ao INCQS no período estabelecido foi realizado consultando-se o Sistema de Gerenciamento de Amostras Laboratoriais (SGAweb e Harpya), com autorização prévia do Coordenador do Núcleo Técnico de Medicamentos. A partir desse sistema, foi elaborada uma planilha Excel apenas com as NP.

Foram definidas as seguintes variáveis para este estudo: modalidade de análise, região de origem, motivo de apreensão, forma de coleta, resultado do ensaio de esterilidade, resultado do laudo analítico, tempo entre a coleta e entrada da amostra no INCQS, volume da amostra, número de amostras encaminhadas por ano, amostras canceladas e órgão fiscalizador de apreensão. Essas informações foram coletadas através da tabela gerada pelo sistema e por meio da análise de processos documentais.

3.1.2 Análise de processos documentais

Os processos das amostras de NP foram analisados, conforme o formulário elaborado (ANEXO A) para coleta dos dados pertinentes aos objetivos do estudo. Esses dados foram coletados dos processos documentais que contém todas as informações e documentos referentes às amostras de NP que foram encaminhadas ao INCQS no período de estudo.

3.2 Cepas bacterianas

Foram estudadas 26 cepas, provenientes de 14 amostras diferentes de NP, tendo sido obtidos a partir do ensaio de esterilidade realizado pelo Setor de Produtos Estéreis do

DM/INCQS. Essas cepas foram identificadas pelo Setor de Identificação Bacteriana do DM/INCQS por meio do sistema automatizado VITEK®2 *Compact* (Bio Mérieux Inc., Durham, North Carolina, USA) como: *Pantoea* spp. (n = 20), *Kluyvera intermedia* (n = 2), *R. radiobacter* (n = 2) e *E. cloacae* (n = 2). Após identificação, essas cepas foram preservadas (Quadro 4).

A preservação foi realizada após confirmação da pureza das cepas por meio da realização de repique por esgotamento em placa com ágar tripticaseína de soja (TSA). Em seguida, foram preparados 20 criotubos para estoque de cada cepa, contendo suspensão do micro-organismo em BHI com 20% de glicerol (v/v) e os mesmos foram mantidos em *freezer* a – 20°C e – 70°C. Em paralelo, foram preparadas dez ampolas de cada cepa para preservação por liofilização, no Setor de Bactérias e Arqueas e, a seguir, foram depositadas na coleção de Bactérias de Referências em Vigilância Sanitária (CBRVS) do INCQS.

Quadro 4 – Cepas provenientes de NP estudadas.

Identificação Sequencial IdBAC	Nº depósito da coleção CBRVS	Micro-organismo (Vitek®2 <i>Compact</i>)	Ano de isolamento	Meio de cultivo do teste de esterilidade	Amostra de NP	Local	Motivo apreensão	Modalidade de Análise
3379	P5774	<i>E. cloacae</i>	2006	TSB	M	Curitiba	Óbito em neonato	Fiscal
3381	P5775	<i>E. cloacae</i>	2006	TSB	N	Curitiba	Óbito em neonato	Fiscal
3878	P5686	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	A	Curitiba	Sepse	Fiscal
3879	P5687	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	A	Curitiba	Sepse	Fiscal
3880	P5688	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	B	Curitiba	Sepse	Fiscal
3881	P5689	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	B	Curitiba	Sepse	Fiscal
3888	P5681	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	C	Curitiba	Investigação	Orientação
3889	P5682	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	C	Curitiba	Investigação	Orientação
3890	P5532	<i>K. intermedia</i>	2013	TSB	D	Curitiba	Investigação	Orientação
3891	P5622	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	D	Curitiba	Investigação	Orientação
3892	P5623	<i>K. intermedia</i>	2013	TSB	E	Curitiba	Investigação	Orientação
3893	P5639	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	E	Curitiba	Investigação	Orientação
3894	P5640	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	F	Curitiba	Investigação	Orientação
3895	P5643	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	F	Curitiba	Investigação	Orientação
3896	P5644	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	G	Curitiba	Investigação	Orientação
3897	P5645	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	G	Curitiba	Investigação	Orientação

Quadro 4 (cont.) – Cepas provenientes de NP estudados.

Identificação Sequencial IdBAC	Nº depósito da coleção CBRVS	Micro-organismo (Vitek®2 Compact)	Ano de isolamento	Meio de cultivo do teste de esterilidade	Amostra de NP	Local	Motivo apreensão	Modalidade de Análise
3898	P5646	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	H	Curitiba	Investigação	Orientação
3899	P5647	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	H	Curitiba	Investigação	Orientação
3900	P5533	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	I	Curitiba	Investigação	Orientação
3901	P5641	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	I	Curitiba	Investigação	Orientação
3902	P5648	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	J	Curitiba	Investigação	Orientação
3903	P5683	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	J	Curitiba	Investigação	Orientação
3904	P5684	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TSB	K	SAP/PR	Investigação	Orientação
3905	P5685	<i>Pantoea</i> spp.	2013	TF	K	SAP/PR	Investigação	Orientação
3909	P5534	<i>R. radiobacter</i>	2013	TSB	L	Curitiba	Investigação	Orientação
3910	P5621	<i>R. radiobacter</i>	2013	TF	L	Curitiba	Investigação	Orientação

Legenda: SAP: Santo Antônio da Platina; NP: nutrição parenteral; TSB: Caldo Tripticaseína de Soja; TF: Tioglicolato Fluido; PR: Paraná; IBAC: Setor de Identificação Bacteriana. CBRVS: Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária. As letras de “A” até “M” representam a identificação codificada dos números das amostras no Sistema Harpya.

Fonte: Do autor, 2018.

3.3 Identificação fenotípica das cepas

Todas as cepas foram previamente identificadas pelo equipamento Vitek®2 Compact no Setor de Bactérias e Arqueas, utilizando o cartão GN (Bacilo Gram Negativo) que contém 64 provas. As provas bioquímicas convencionais foram feitas para complementar as provas do equipamento e para confirmar o resultado fornecido pelo Vitek®2 Compact, que é baseado no seu banco de dados e no perfil geral das provas executadas.

As 26 cepas foram submetidas às provas bioquímicas convencionais descritas no Manual Bergey’s de Bacteriologia Sistemática (2005) e no *Manual of Clinical Microbiology* (2015) para bactérias da família Enterobacteriaceae e para bastonetes Gram negativos não fermentadores. A partir do criotubo estoque, onde a cepa havia sido preservada, foi feito um repique em TSB, incubando o tubo a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Então, o inóculo foi transferido para uma placa de Petri com TSA, onde foi semeado pela técnica de esgotamento. A placa foi incubada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

A pureza da cultura foi avaliada visualmente e as colônias foram submetidas a testes fenotípicos: coloração pelo método de Gram, teste da produção da citocromo oxidase, catalase, redução de nitrato a nitrito em caldo nitrato, produção de indol, motilidade, hidrólise

de esculina, gelatina e ureia, produção de H₂S, teste de oxidação-fermentação da glicose, reação de Voges-Proskauer e vermelho de metila em meio de cultura caldo Vermelho de metila-Voger Proskauer (MR-VP), fenilalanina desaminase, utilização de citrato e malonato, lisina e ornitina descarboxilases, arginina diidrolase, produção de gás a partir de D-glicose, DNase (Desoxirribonuclease) e fermentação de carboidratos (lactose, sacarose, frutose, galactose, D-manitol, dulcitol, salicina, adonitol, myo-inositol, D-sorbitol, L-arabinose, rafinose, L-ramnose, maltose, D-xilose, trealose, celobiose, α -metilglicosídeo, eritritol, melibiose, melizitose, D-arabitol, glicerol, D-manose). Os testes foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por até 1 semana, realizando-se leituras a cada 24 horas. As provas para DNase e gelatinase foram executadas em temperatura de 25°C . Foram incluídos os controles específicos para cada prova bioquímica (BERGEY'S..., 2005b; FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015).

Para a confirmação de identificação do *R. Radiobacter*, foi utilizada, em paralelo, a cepa de referência INCQS 00346 (ATCC 4720); a temperatura de incubação das cepas foi de 30°C e os repiques foram feitos em caldo nutriente (CN) e agar nutriente (AN), conforme descrito no informe técnico da cepa.

3.4 Identificação proteômica em MALDI-TOF MS

A cultura das cepas foi obtida por crescimento em TSB a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas e posterior esgotamento em placa com agar sangue (AS), a fim de se obter colônias isoladas, incubando-se também a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Foi feito um esfregão de uma colônia de cada cepa em um poço (*spot*) da lâmina (*slide*) do modelo Flexi-Mass-DS TO-430 (BioMérieux), onde o laser foi incidido. A matriz utilizada foi 1 μL ácido α -hidroxicinâmico (CCHA) do VITEK®MS RUO (BioMérieux). Como controle de qualidade da análise e calibrador, foi realizado também um esfregão, no *spot* da lâmina, da cepa de referência de *Escherichia coli* ATCC 8739. Após a cristalização da matriz, os slides foram inseridos no equipamento VITEK MS® RUO (MALDI-TOF/MS, modelo AXIMA, Kratos/Shimadzu), localizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ). O equipamento possui um laser de nitrogênio no comprimento de onda de 337 nanômetros (nm). Os resultados obtidos foram analisados pelo *software* SARAMIS Premium (Database version 4.10 e System version 4.0.0.4, 2010).

Após a leitura, foi contruída a árvore de similaridade. O dendrograma foi montado de acordo com o algoritmo interno do *software* SARAMIS Premium, baseando-se na similaridade entre os espectros das cepas.

O equipamento considera um percentual de 70% de confiança de similaridade entre a cepa isolada e cepas cadastradas em seu banco de dados para que sejam considerados da mesma espécie. Abaixo desse percentual, a cepa isolada não é identificada, podendo ser sugerida a família ou gênero no qual ele pertence. Porém, para alguns casos, o equipamento pode sugerir espécies próximas com percentual de similaridade entre a cepa cadastrada e a cepa isolada.

3.5 Identificação genotípica das cepas

3.5.1 Extração de DNA

Após realização da caracterização fenotípica e confirmação da pureza, as cepas foram submetidas à certificação taxonômica por métodos genotípicos.

A partir do criotubo congelado de cada cepa, foram retirados 100 µL e transferidos para um tubo contendo meio TSB e incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 4 horas. A partir do cultivo em caldo, foi realizado um repique em TSA em placa, incubada a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas. Para as cepas 3909 e 3910, foram utilizados os meios CN e AN, com temperatura de 30°C e tempo de incubação de 24 horas.

A extração do DNA genômico foi realizada através do *Kit DNAeasy Blood & Tissue* (Qiagen®), utilizando-se o protocolo para bactérias Gram negativas, seguindo as recomendações do fabricante. A enzima Proteinase K foi utilizada na concentração de 20 mg/mL.

Algumas cepas tiveram também o DNA obtido pela técnica de lise térmica, pois a extração feita pelo kit em algumas cepas não foi eficaz para a amplificação do gene *rrs*. Após reativação e verificação da pureza, foi transferida uma alçada de crescimento bacteriano fresco (a partir do meio de cultivo em placa) para um microtubo contendo 500 µL de água livre de DNase e RNase (ribonuclease). Os tubos foram colocados em banho maria durante 15 minutos e depois foram congelados imediatamente em *freezer* – 20°C . Os microtubos foram centrifugados por 1 minuto a 26.000 g antes de serem utilizados, a fim de sedimentar os resíduos celulares.

A verificação da integridade do DNA foi feita aplicando-se 10 µL do DNA extraído com 2 µL de tampão Tris-Acetato-EDTA 40X (TAE) e 5 µL de tampão de corrida em gel de agarose (UniScience) a 1,2% em TAE 1X numa voltagem de 60 V durante 3 horas. O gel foi corado com solução a 10 mg/mL de brometo de etídio, tendo sido analisado em equipamento

de vídeo documentação (Universal Hood, BioRad®).

A quantificação do DNA obtido foi feita no equipamento Nanodrop™ 2000C (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Após a dosagem, o DNA foi diluído 10 vezes em água livre de DNase e RNase, obtendo-se uma concentração final entre 10 a 20 ng/μL.

3.5.2 Amplificação por PCR

3.5.2.1 Gene *rrs*

A amplificação do gene *rrs* pela PCR foi realizada para todos as 26 cepas do estudo, utilizando-se os iniciadores universais PAF e 1492R descritos por Watts et al (2000) e Lane et al (1991), respectivamente (Quadro 5 – item 3.5.2.2). As reações de amplificação foram preparadas com 10 μL de tampão verde 5X (Promega®), 6 μL do MgCl₂ a 25 mM, 0,3 μL da *Taq* polimerase a 5 U/μL (Promega®), 1 μL de dNTP a 10 mM, 1 μL de cada iniciador (Invitrogen®) a 100 ng/μL, 3 μL de DNA diluído e água livre de DNase e RNase suficiente para completar um volume de 50 μL de reação por microtubo.

As amplificações foram realizadas em termociclador Gene Amp – PCR System 9700 da Applied Biosystems®, programado com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Cada ciclo foi composto pelas seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e meio (GUO et al, 2008).

Foram submetidos à eletroforese, um volume de 5 μL dos produtos da PCR e 3 μL do padrão de tamanho molecular (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen®) de 100 pb junto com 2 μL de tampão de corrida, em gel de agarose 1,5% (p/v), a 60 V por 1 hora em tampão TAE 1X. Os fragmentos foram marcados para revelação, após a corrida, com solução de brometo de etídio a 10 mg/mL, sendo visualizados em sistema de vídeo documentação (BioRad®).

A amplificação do gene *rrs* foi realizada no laboratório da Coleção de Bactérias em Ambientes e Saúde (CBAS) do IOC (Instituto Oswaldo Cruz).

3.5.2.2 Genes *gyrB*, *rpoB*, *atpD*, *infB* (MLSA)

A amplificação dos genes *atpD*, *infB*, *gyrB* e *rpoB* foi feita em 16 cepas: 3379, 3381, 3878, 3880, 3881, 3889, 3890, 3891, 3892, 3893, 3894, 3896, 3900, 3902, 3903 e 3905. A

seleção foi baseada nos resultados da espectrometria de massa em MALDI-TOF. O protocolo para a PCR desses genes foi feito de acordo com Brady et al (2008), com algumas modificações, conforme descrito no Quadro 6. Os pares de iniciadores utilizados para cada gene estão listados no Quadro 5.

As amplificações foram realizadas em termociclador Amplitherm – Thermal cyclers TX96 da Bellatri Biotecnologia®, programado com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 3 ciclos: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento de 50°C, 57 °C ou 60°C (de acordo com o Quadro 6) por 2 minutos e 15 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 15 segundos; seguidos de 30, 35 ou 40 ciclos (de acordo com o Quadro 6): desnaturação a 95°C por 35 segundos, anelamento de 50°C, 57 °C ou 60°C (de acordo com o Quadro 6) por 1 minuto e 15 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto e 15 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Foram submetidos à eletroforese, um volume de 5 µL dos produtos da PCR e 2 µL do padrão de tamanho molecular (123 pb DNA Ladder – Invitrogen®), cada um deles com 2 µL de tampão de corrida, em gel de agarose 1,0% (p/v), a 60 V por 1 hora em tampão TAE 1X. Os fragmentos foram marcados para revelação, após a corrida, com solução de brometo de etídio a 10 mg/mL, sendo visualizados em sistema de vídeo documentação (Transiluminador L.Pix, Loccus Biotecnologia®).

Quadro 5 – Iniciadores utilizados na amplificação dos genes *rrs*, *gyrB*, *rpoB*, *atpD*, *infB*.

Gene	Fragmento	Iniciador	Sequência do iniciador 5'-3'	Referência
<i>rrs</i>	1500 pb	PAF	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WATTS et al, 2000
		1492R	TACCTTGTTACGACTT	LANE et al, 1991
<i>gyrB</i>	1000 pb	gyrB 01-F	TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAGT	BRADY et al., 2008
		gyrB 02-R	CMCCYTCCACCARGTAMAGTT	BRADY et al., 2008
<i>rpoB</i>	1100 pb	rpoB CM7-F	AACCAGTTCCGCGTTGGCCTG	BRADY et al., 2008
		rpoB CM31b-R	CCTGAACAACACGCTCGGA	BRADY et al., 2008
<i>atpD</i>	900 pb	atpD 01-F	RTAATYGGMGCSGTRGTNGAYGT	BRADY et al., 2008
		atpD 02-R	TCATCCGCMGGWACRTAWAYNGCCTG	BRADY et al., 2008
<i>infB</i>	1200 pb	infB 01-F	ATYATGGGHCAYGTHGAYCA	BRADY et al., 2008
		infB 02-R	ACKGAGTARTAACGCAGATCC A	BRADY et al., 2008

Fonte: (Adaptado de VIDAL, 2013).

Quadro 6 – Condições da reação de PCR utilizada para amplificação dos genes *gyrB*, *rpoB*, *atpD*, *infB*.

Reagentes (50 µL de reação)	Genes			
	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>	<i>rpoB</i>
Tampão	5 µL (10x)	5 µL (10x)	10 µL (5x)	5 µL (10x)
MgCl ₂	3 µL (25 mM)	4 µL (25 mM)	4 µL (25 mM)	3 µL (25 mM)
dNTP	1 µL (1 mM)	1 µL (10 mM)	1 µL (1 mM)	1 µL (1 mM)
Primer <i>forward</i>	1 µL (25 µM)	1 µL (25 µM)	1 µL (10 µM)	1 µL (25 µM)
Primer <i>reveser</i>	1 µL (25 µM)	1 µL (25 µM)	1 µL (10 µM)	1 µL (25 µM)
<i>Taq</i> polimerase	0,4 µL <i>JumpStart</i> Sigma-Aldrich® (2,5 U/µL)	0,6 µL <i>JumpStart</i> Sigma-Aldrich® (2,5 U/µL)	0,2 µL <i>Go taq</i> Promega® (5 U/µL)	0,4 µL <i>JumpStart</i> Sigma-Aldrich® (2,5 U/µL)
DNA	5 µL	3 µL	5 µL	5 µL
Água livre de DNase e RNase	33,6 µL	34,4 µL	27,8 µL	33,6 µL
Parâmetros de ciclagem				
	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>	<i>rpoB</i>
Anelamento	57°C	50°C	60°C	57°C
Número de ciclos	35	30	40	35

Fonte: Do autor, 2018.

3.5.3 Purificação do fragmento amplificado

Os produtos da PCR do gene *rrs* foram purificados pelo *Kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE®) e visualizados em gel de agarose 1,5% em TAE 1X (p/v), a 60 V por 1 hora, aplicando-se um volume de 5 µL dos produtos da PCR e 2 µL de tampão de corrida. Para comparação das bandas foi utilizado 2 µL do peso molecular (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen®) e 2 µL de tampão de corrida. O gel foi corado com solução de brometo de etídio a 10 mg/mL e visualizado em sistema de vídeo documentação (BioRad®).

Os fragmentos amplificados dos genes *atpD*, *infB*, *gyrB*, e *rpoB* foram purificados pelo *Kit Qiaquick® PCR Purification* (Qiagen®) e visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v), a 60 V por 1 hora em tampão TAE 1X, aplicando-se um volume de 5 µL dos produtos da PCR e 2 µL do padrão de peso molecular (123 pb DNA Ladder – Invitrogen®), cada um deles junto com 2 µL de tampão de corrida. Os fragmentos foram marcados para revelação, após a eletroforese, com solução de brometo de etídio a 10 mg/mL, sendo visualizados em sistema de vídeo documentação (Transiluminador L.Pix, *Loccus* Biotecnologia®).

Ambos os protocolos de purificação utilizados foram baseados nas recomendações do fabricante, adicionando-se apenas uma etapa final em cada um deles. Após a transferência do tampão de eluição para a coluna, antes da centrifugação final, foram aguardados 15 minutos em temperatura ambiente e depois a coluna junto ao microtubo foi colocada em banho seco a 55°C por 5 minutos. Decorrido esse tempo, a coluna foi centrifugada a 22.000 g por 1 minuto para eluição total do fragmento no microtubo, que foi mantido em *freezer* – 20°C até sua utilização na reação de sequenciamento.

3.5.4 Sequenciamento dos genes *rrs*, *atpD*, *gyrB*, *infB* e *rpoB*

Para cada cepa, foram realizadas seis reações de sequenciamento do gene *rrs*. Os amplicons foram sequenciados com um iniciador utilizado na amplificação do gene *rrs* e mais cinco iniciadores diferentes, conforme Quadro 7. Para as reações de sequenciamento dos outros genes, foram utilizados iniciadores diferentes dos usados na amplificação.

Quadro 7 – Iniciadores utilizados no sequenciamento dos genes *rrs*, *gyrB*, *rpoB*, *atpD*, *infB*.

Gene	Iniciador	Sequência do iniciador 5'-3'	Referência
<i>rrs</i>	1492R	TACCTTGTTACGACTT	LANE et al, 1991
	1831F	GAGGAACACCGATGGCGAAGG	WATTS et al, 2000
	1832R	GCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT	WATTS et al., 2000
	519R	GTATTACCGCGGCGGCTG	JONHSON, 1994
	321R	AGTCTGGACCGTGTCTCAGT	GERHARDT et al, 1994
	1112F	GCAACGAGCGCAACCC	RAINEY et al, 1996
	1093R*	GTT GCG CTC GTT GCG GGA CT	LANE et al, 1991
<i>gyrB</i>	gyrB 07-F	GTVCGTTTCTGGCCVAG	BRADY et al., 2008
	gyrB 08-R	CTT TAC GRC GKG TCA TWT CAC	BRADY et al., 2008
<i>rpoB</i>	rpoB CM81-F	CAGTTCGCGTTGGCCTG	BRADY et al., 2008
	rpoB CM81b-F	TGATCAACGCCAAGCC	BRADY et al., 2008
	rpoB CM32b-R	CGGACCGGCCTGACGTTGCAT	BRADY et al., 2008
<i>atpD</i>	atpD 03-F	TGCTGGAAGTKCAGCARCAG	BRADY et al., 2008
	atpD 04-R	CCMAGYARTGCGGATACTTC	BRADY et al., 2008
<i>infB</i>	infB 03-F	ACGGBATGATYACSTTCCTGG	BRADY et al., 2008
	infB 04-R	AGYTTAGATTTCTGCTGACG	BRADY et al., 2008

*Iniciador utilizado apenas para as cepas 3379, 3381, 3901, 3900, 3901, 3902, 3903 e 3905.

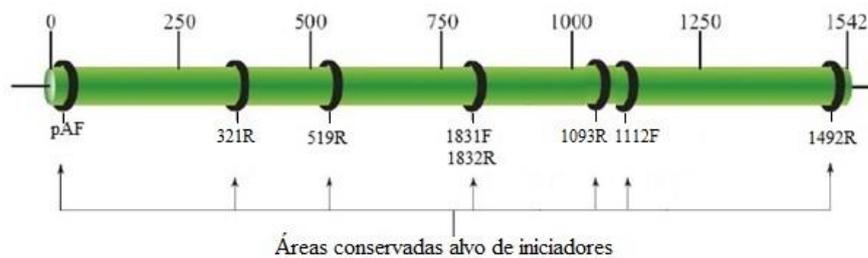
Fonte: (Adaptado de VIDAL, 2013).

Para cada reação de sequenciamento, foram adicionados de 2 a 5 µL de produto

amplificado purificado, 1 μL de *primer*, 2,5 μL de *mix* para reação de sequenciamento, composto por 1 μL de BigDye® + 1,5 μL de tampão 5x (BigDye®; Applied Biosystems, Foster City, CA) e água purificada para completar um volume de 10 μL de reação. O sequenciamento teve como base o método de Sanger et al (1977) e foi realizado no equipamento Applied Biosystems ABI Prism 3730, um sequenciador de DNA automatizado (OTTO et al, 2008), pertencente à Plataforma de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ.

No método de sequenciamento utilizado, para sequenciar um gene com tamanho aproximado de 1.500 pb, é necessária a utilização de diversos iniciadores internos no sequenciamento para obter uma sequência consenso com o tamanho semelhante ao do gene *rrs*, como ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema mostrando o gene *rrs* e os iniciadores utilizados no sequenciamento.



Legenda: *Forward* (F) →; *Reverse* (R) ←.

Fonte: (Adaptado de PETTI; RELLER; WEINSTEIN, 2007).

3.5.5 Análise das sequências nucleotídicas

As sequências consenso de cada gene foram analisadas e editadas no programa SeqMan NGen v. 7.00 do *software* DNASTAR Lasergene. As sequências do gene *rrs* foram analisadas frente ao banco de dados da plataforma online EzBioCloud (YOON et al, 2018), que possui sequência desse gene das espécies bacterianas descritas e validadas pelo *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. As sequências dos genes *atpD*, *gyrB*, *infB* e *rpoB* foram compradas ao banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) via BLAST.

3.5.6 Análise filogenética

Para a elaboração de árvores filogenéticas, as sequências consenso foram alinhadas no *software* Clustal X 2.1. As árvores filogenéticas foram montadas no programa MEGA versão 6, utilizando-se o método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) para inferir a história

evolutiva. A robustez das topologias foi realizada através da análise de *bootstrap* (1.000 réplicas) e a distância evolutiva foi calculada com base no método Kimura dois-parâmetros (KIMURA, 1980).

Para a elaboração da árvore filogenética concatenada, as sequências consenso dos genes *atpD*, *gyrB*, *infB* e *rpoB* foram cortadas no programa BioEdit v7.0.5 e, posteriormente, foi montada manualmente uma sequência única por cepa contendo os quatro genes. A sequência única concatenada de cada cepa foi alinhada no *software* Clustal X 2.1 e a árvore filogenética concatenada foi montada no programa MEGA versão 6, utilizando-se os mesmos parâmetros citados no parágrafo acima.

Posteriormente o relacionamento filogenético foi determinado utilizando as espécies mais próximas, determinadas de acordo com resultados obtidos em comparação com sequências de cepas tipo depositadas no BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no EzBioCloud.

3.6 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Foi realizado teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nas cepas, conforme preconizado pelo Manual do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), pelo MDD de Kirby-Bauer modificado (CLSI, 2018).

A partir dos criotubos, foi realizado, para cada cepa, um repique com alça bacteriológica em TSB e os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Então, esse crescimento foi inoculado em placa de Petri com TSA por 18 a 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, empregando-se a técnica de esgotamento, a fim de se obter colônias isoladas.

As colônias obtidas após esse crescimento, foram resuspensas em tubo 75 x 12 mm contendo 2 mL de solução de cloreto de sódio estéril a 0,85%. A turvação da suspensão foi equivalente com o grau 0,5 da escala de Mc Farland ($\sim 1,5 \times 10^8$ células/mL), medida pelo equipamento Densichek Plus (Bio Mérieux, Inc. Durham, NC/USA), um espectrofotômetro que fornece leitura direta na escala de Mc Farland. Foram utilizados padrões calibrados (Bio Mérieux, Inc. Durham, NC/USA) de grau 0, 0,5, 2 e 3, para verificação da calibração do equipamento. As suspensões foram semeadas em placas contendo meio de cultura ágar Mueller-Hinton (AMH) com o auxílio de *swab* de modo que fosse aplicado em três direções confluentes diferentes. Então, foram acrescentados à superfície do ágar, os discos impregnados com antimicrobianos, e as placas incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 18 horas. Após o período de incubação, o diâmetro das zonas de inibição, formadas em cada disco, foi

medido com paquímetro. A leitura foi efetuada por meio de uma consulta à tabela disponível no CLSI (2018) com os valores de *breakpoint* para cada antimicrobiano utilizado. Como o manual do CLSI não abrange o gênero *Rhizobium*, os resultados da leitura de halo foram extrapolados para bactérias Gram negativas.

Os antimicrobianos empregados foram: Cefuroxina (30 µg); ciprofloxacina (5 µg); gentamicina (10 µg); trimetopima/sulfametoxazol (25 µg); meropenema (10 µg); imipenema (10 µg); cefazolina (30 µg); amoxicilina/ácido clavulânico (20 µg/ 10 µg); ampicilina (10 µg); aztreonam (30 µg); amicacina (30 µg); ceftazidima (30 µg); cefepima (30 µg); ceftazidima (30µg); ceftriaxona (30 µg); tetraciclina (30 µg); ertapenema (10 µg); piperaciclina/tazobactam (100 µg/ 10 µg); tobramicina (10 µg); levofloxacina (5 µg); cloranfenicol (30 µg).

O controle de qualidade do método foi realizado utilizando-se, em paralelo, as seguintes cepas de referência: *E. coli* INCQS n° 00033 (ATCC n° 25922), *E. coli* INCQS n° 00325 (ATCC 35218) e *Pseudomonas aeruginosa* INCQS n° 00099 (ATCC n° 27853).

4 RESULTADOS

4.1 Levantamento de dados e análise de processos documentais

De acordo com o levantamento de dados realizado por meio dos sistemas SGAweb e *Harpya*, foram encaminhadas ao INCQS um total de 134 amostras de NP no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016. Essas amostras foram analisadas de acordo com a modalidade de análise, amostras canceladas, motivo de apreensão, resultado do ensaio de esterilidade, resultado do laudo analítico, forma de coleta, tempo entre a coleta e a entrada da amostra no INCQS, volume das amostras, órgão fiscalizador, região de origem das amostras de NP e número de amostras encaminhadas por ano.

4.1.1 Número de amostras encaminhadas por ano

A Figura 2 mostra a distribuição por ano das amostras de NP encaminhadas ao INCQS, observando-se que em vários anos não houve entrada de amostra desse produto no Instituto. As amostras de NP foram apreendidas conforme uma demanda espontânea, logo a distribuição anual não foi uniforme. As 134 amostras de NP podem ser divididas em cinco grandes grupos de acordo com diferentes períodos e algumas com suspeita de contaminação:

a) o primeiro grupo de amostras foi apreendido com suspeita de causar hipoglicemia e evento adverso em neonato, totalizando 15 amostras. As amostras foram encaminhadas ao INCQS no ano de 2001 para realização da pesquisa de insulina. Os laudos analíticos foram satisfatórios.

b) o segundo grupo foi representado por 12 amostras de NP encaminhadas ao INCQS no final de 2005 e início de 2006. Foram apreendidas sob suspeita de contaminação bacteriana. Sete amostras foram submetidas ao ensaio de esterilidade, sendo que três apresentaram resultado insatisfatório, portanto estavam contaminadas.

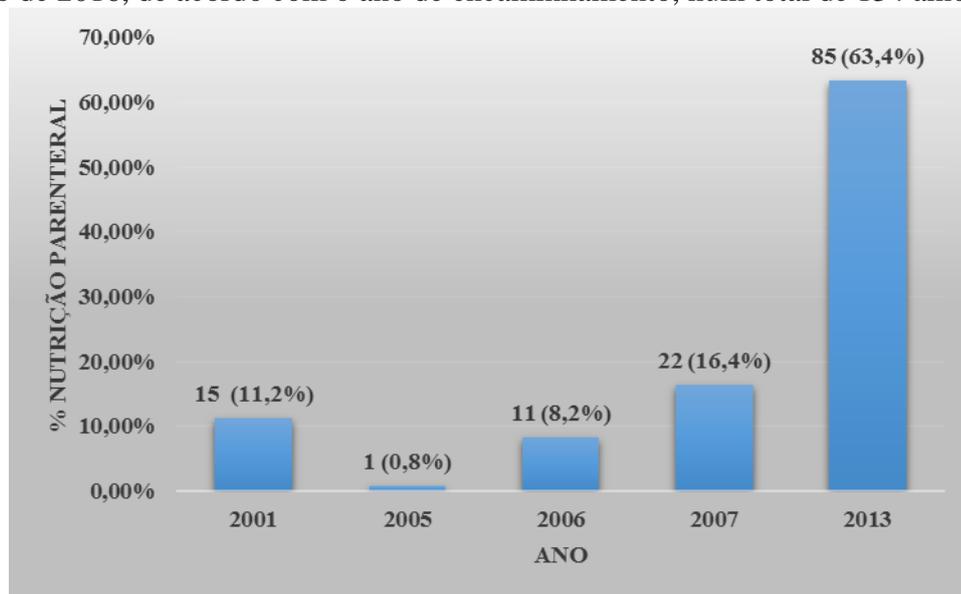
c) o terceiro grupo foi recebido no INCQS no ano de 2007, sendo encaminhadas 20 amostras de NP com suspeita de contaminação bacteriana. Todas as amostras foram submetidas ao ensaio de esterilidade e tiveram seus laudos analíticos satisfatórios.

d) o quarto grupo foi também recebido em 2007, no mês de junho, com duas amostras encaminhadas devido a óbito em paciente. Ambas as amostras apresentaram resultado satisfatório no ensaio de esterilidade.

e) o quinto grupo foi encaminhado ao INCQS no final de 2013, totalizando 85

amostras de NP de diferentes hospitais relacionadas a um mesmo surto. Todas essas amostras vieram da região Sul. O percentual de amostras insatisfatórias foi de aproximadamente 14% (12 amostras). Esse surto foi recentemente publicado por Pillonetto et al (2018).

Figura 2 - Amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, de acordo com o ano de encaminhamento, num total de 134 amostras.



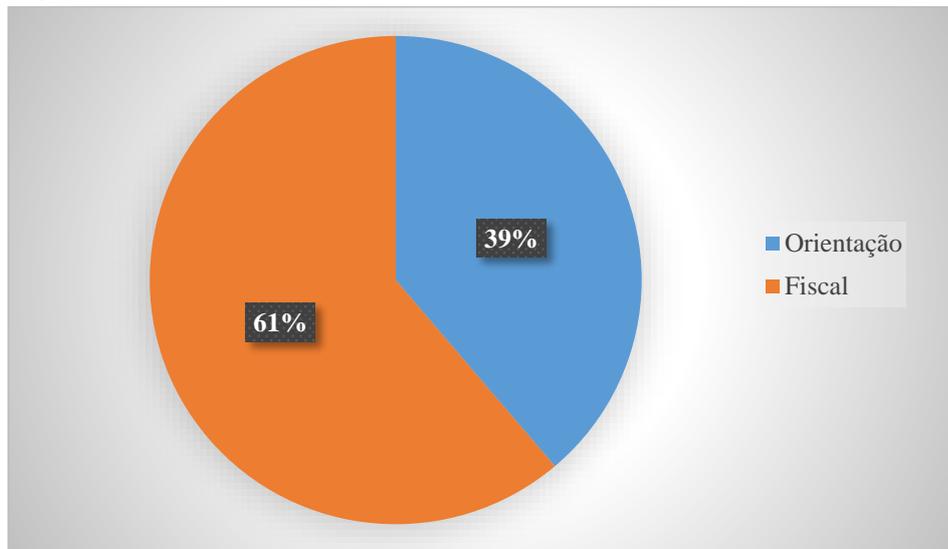
Fonte: Do autor, 2018.

4.1.2 Modalidade de análise

As amostras de NP foram oriundas de demanda espontânea, sendo 82 (61%) encaminhadas ao INCQS como modalidade fiscal e 52 (39%) como orientação (Figura 3). Das 52 amostras encaminhadas ao INCQS sob modalidade de análise de orientação, nove foram direcionadas ao Departamento de Química e 44 apreendidas para investigação por problemas de contaminação, das quais nove (20,5%) tiveram seu resultado insatisfatório no ensaio de esterilidade. No caso das 82 amostras encaminhadas sob a modalidade fiscal, 75 foram apreendidas por problemas de contaminação, das quais seis (8%) apresentaram resultado insatisfatório no ensaio de esterilidade.

Figura 3 - Percentual de amostras de NP encaminhadas ao INCQS de acordo com a

modalidade de análise no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.



Fonte: Do autor, 2018.

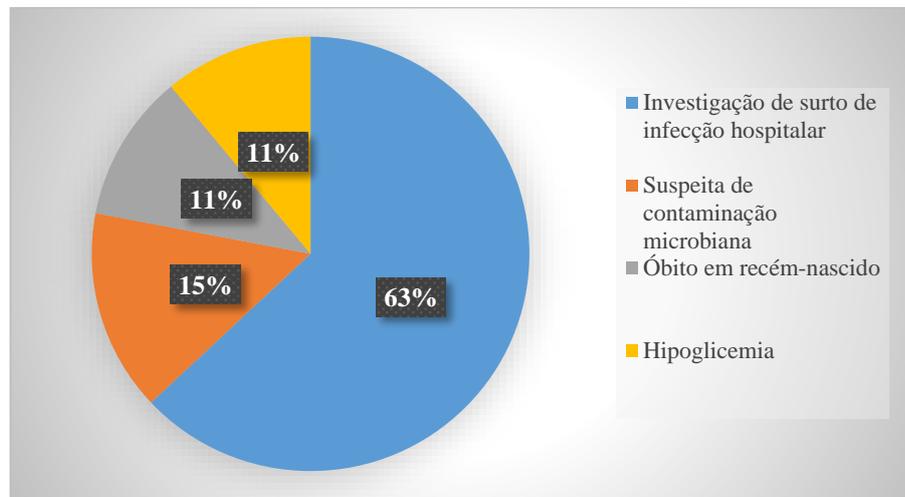
4.1.3 Amostras canceladas

Dentre as 134 amostras de NP apreendidas e encaminhadas ao INCQS no período de análise, seis delas foram canceladas (4,5%). Os motivos de cancelamento da análise foram: por estarem violadas (quatro amostras); pela empresa não reconhecer seu produto (uma amostra); e tampa da agulha da seringa quebrada (uma amostra).

4.1.4 Motivo de apreensão

Os motivos de apreensão descritos no cadastro das amostras de NP selecionadas neste estudo estão representados na Figura 4. Dentre eles, 119 (89%) foram relacionados a problemas de contaminação microbiana e 15 (11%), a problemas metabólicos. Os motivos de apreensão cadastrados são derivados do Termo de Apreensão de Amostra (TAA).

Figura 4 - Motivo da apreensão das amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.

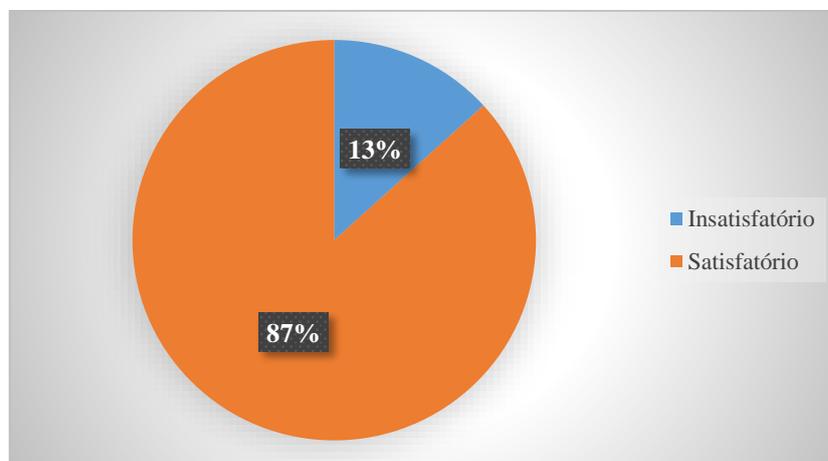


Fonte: Do autor, 2018.

4.1.5 Resultado do ensaio de esterilidade

Do total de 134 amostras, 113 amostras de NP foram submetidas ao ensaio de esterilidade. Aproximadamente 87% (98 amostras) estavam satisfatórias e 13% (15 amostras), insatisfatórias, conforme ilustra a Figura 5. Entre as amostras insatisfatórias, seis foram apreendidas como análise fiscal. Nove amostras foram provenientes de análise de orientação e mesmo não tendo sido relatados no TAA problemas nos pacientes, elas apresentaram contaminação bacteriana.

Figura 5 - Resultado do ensaio de esterilidade das amostras de NP no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 113 amostras.

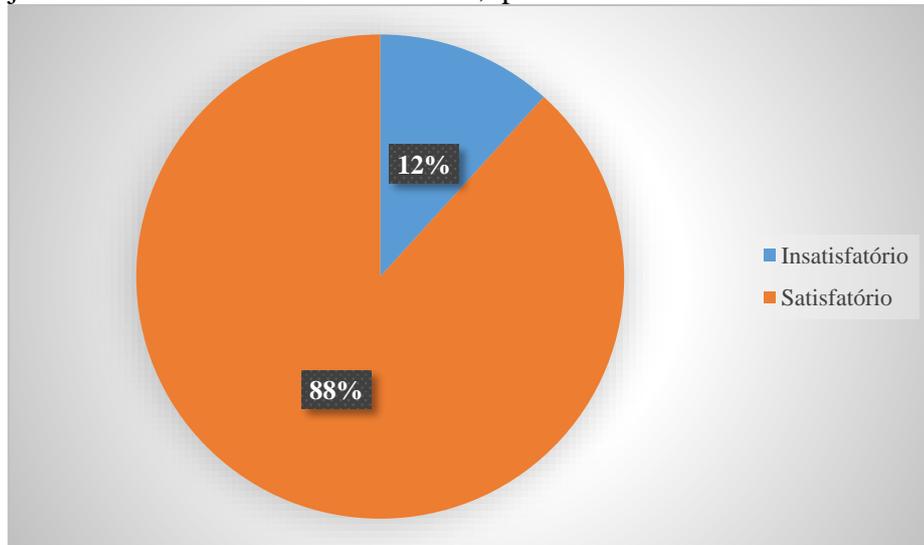


Fonte: Do autor, 2018.

4.1.6 Resultado final do laudo analítico

O resultado do laudo analítico se assemelhou ao resultado do ensaio de esterilidade (Figura 6), visto que, na maioria das amostras que entrou no INCQS, foi realizado o ensaio de esterilidade, com exceção de apenas 15 amostras, que foram encaminhadas para análise de insulina, realizada no Departamento de Química.

Figura 6 - Resultado final do laudo analítico das amostras de NP analisadas no INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 128 amostras analisadas.



Fonte: Do autor, 2018.

O percentual de amostras de NP reprovadas analisadas no INCQS foi de aproximadamente 12% (15 amostras).

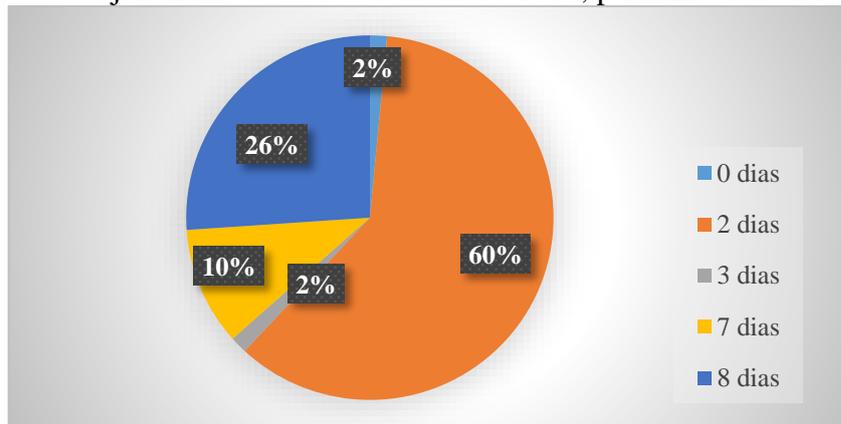
4.1.7 Forma de coleta

Todas as 134 amostras de NP foram coletadas como amostras únicas devido à natureza do produto, pois as farmácias de manipulação retiram uma única alíquota da bolsa produzida para amostra de contraprova, como é chamada pela Portaria nº 272/1998. Por ser amostra única, os ensaios, nos quais as amostras foram submetidas, foram realizados na presença de um representante legal do fabricante e de um perito de sua escolha (BRASIL, 1977).

4.1.8 Tempo entre a coleta e a entrada de amostra no INCQS

O tempo entre a coleta e a entrada da amostra de NP no INCQS variou de 0 a 8 dias, sendo predominante o tempo de 2 dias, com um percentual de 60%, conforme mostra a Figura 7. Das 15 amostras de NP que apresentaram resultado insatisfatório no ensaio de esterilidade, 14 (93,3%) chegaram ao instituto dois dias depois da apreensão e uma amostra (6,7%) em sete dias.

Figura 7 - Tempo decorrido entre a apreensão e a entrada da amostra de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.



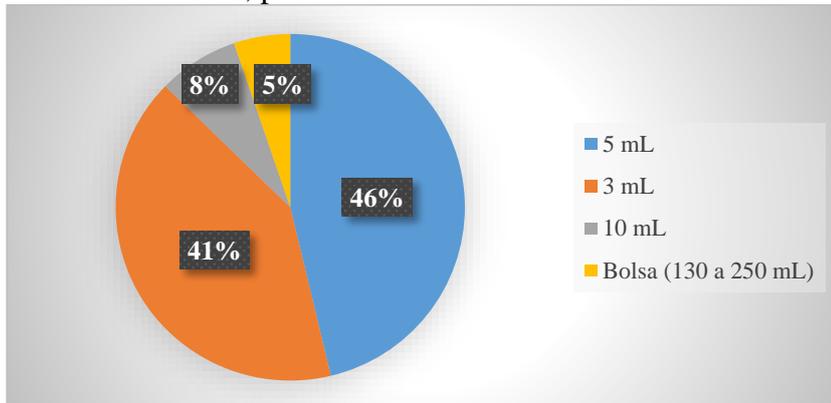
Fonte: Do autor, 2018.

4.1.9 Volume da amostra

As amostras de NP podem ser apreendidas na forma de bolsas manipuladas ou em seringas. As que foram encaminhadas ao INCQS possuíam volume variando de 3 mL a 250 mL, conforme Figura 8. Cento e vinte e sete (95%) amostras foram coletadas em seringas através de agulhas, que são utilizadas para retirar um volume da bolsa de NP assim que a mesma é produzida. A maioria das amostras em seringas continha 5 mL da NP produzida (46%). Sete amostras foram encaminhadas ao INCQS na forma de bolsa.

Das 15 amostras insatisfatórias no ensaio de esterilidade, nove (60%) tinham um volume de 5 mL e seis (40%), um volume de 10 mL.

Figura 8 - Volume das amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.

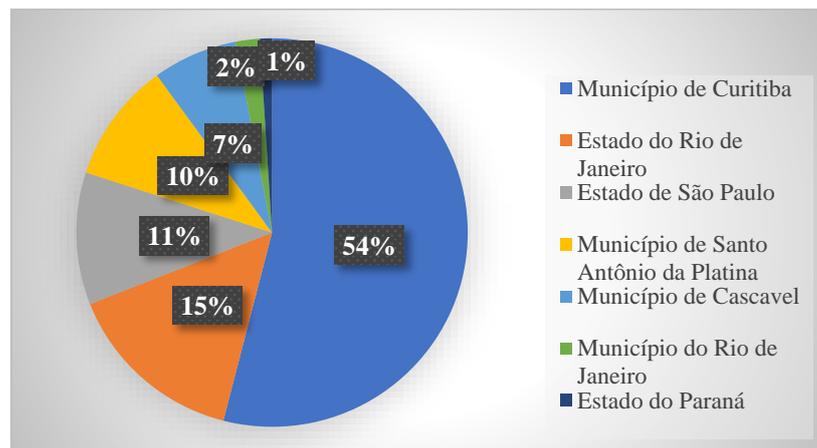


Fonte: Do autor, 2018.

4.1.10 Órgão fiscalizador

No levantamento realizado, foi observado que grande parte das amostras (54%) foi apreendida pela Vigilância Sanitária do município de Curitiba (Figura 9). Os estados do Rio de Janeiro e de São Paulo foram responsáveis por 15% e 11%, respectivamente, das apreensões das amostras.

Figura 9 - Órgãos de vigilância sanitária responsáveis pelas apreensões de amostras de NP encaminhadas ao INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, em um total de 134 amostras.



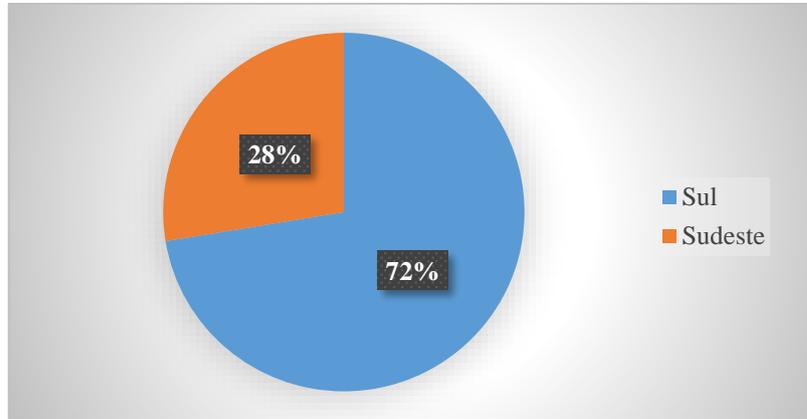
Fonte: Do autor, 2018.

4.1.11 Região de origem

A maior parte das amostras de NP foi apreendida na Região Sul do Brasil (72%). A Região Sudeste estava representada em 28% das amostras encaminhadas ao INCQS (Figura 10). As demais regiões (Centro-oeste, Nordeste e Norte) não apresentaram nenhuma

apreensão de amostra de NP que fosse encaminhada ao INCQS no período do estudo.

Figura 10 - Percentual de amostras de NP que foram encaminhadas ao INCQS de acordo com a região de origem no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016, para um total de 134 amostras.



Fonte: Do autor, 2018.

4.1.12 Surtos relatados na documentação encaminhada com as amostras

As amostras de NP encaminhadas ao INCQS entre 2000 a 2016 podem ser divididas em quatro grupos, de acordo com os relatos de surtos ocorridos no Brasil, descritos nos respectivos documentos que acompanhavam as amostras. Nos tópicos abaixo, esses surtos serão descritos em ordem cronológica, com base nas informações coletadas nos processos e publicações científicas.

4.1.12.1 Surto 1

O primeiro surto do período de estudo ocorreu em outubro de 2005 em Curitiba, no qual uma amostra de NP suspeita foi apreendida pelo LACEN-PR, sob denúncia de estar relacionada ao óbito em três neonatos. A amostra (1 bolsa de NP) que foi encaminhada sob modalidade fiscal ao INCQS em 27 de dezembro de 2005, estava violada. Por isso, não foi possível realizar o ensaio de esterilidade.

Em uma análise preliminar realizada no hospital, foi detectada uma contaminação por bacilo Gram negativo, mas não foram fornecidos dados de possível identificação. Um dos pacientes apresentou hiperemia, vermelhidão e edema da parede abdominal.

No dia 05 de janeiro de 2006, foram encaminhadas mais três amostras de NP (3 bolsas), porém, foram provenientes de denúncia feita por outro hospital de Curitiba.

Novamente, essas três amostras foram canceladas porque estavam abertas.

Em 10 de fevereiro de 2006, foram encaminhadas ao INCQS mais oito amostras de NP relacionadas a cinco diferentes hospitais de Curitiba. Essas amostras vieram em forma de seringa, provavelmente se tratando das amostras de contraprova que ficaram retidas na empresa produtora da NP. Dessas oito NP, sete foram submetidas ao ensaio de esterilidade, no qual três (42,9%) apresentaram resultado insatisfatório. Uma amostra foi cancelada porque a empresa não reconheceu como sendo seu o produto.

No laudo emitido pelo INCQS, constava que a contaminação era por uma bactéria Gram negativa, fermentadora de glicose, pertencente à família Enterobacteriaceae, possivelmente se tratando de *Enterobacter intermedius*, *Rahnella aquatilis*, *P. agglomerans* ou *E. cloacae*.

O INCQS solicitou ao órgão de Vigilância Sanitária, a Certidão de Regularidade da Farmácia, Alvará de Funcionamento, Comprovante da inscrição e de situação cadastral, além de esclarecimentos sobre a apreensão. Os fiscais foram até a farmácia de manipulação e aplicaram o roteiro de inspeção na empresa, que colaborou com as investigações, porém, com base nos dados presentes nos processos, não foi possível encontrar a fonte de contaminação.

De acordo com a documentação enviada, cepas identificadas como 3379 e 3381 correspondem a este surto (Quadro 4 – item 3.2). A cepa proveniente da terceira amostra contaminada não foi localizada no acervo do Setor de Bactérias e Arqueas.

4.1.12.2 Surto 2

Esse surto ocorreu no Rio de Janeiro, em 2007. O órgão de Vigilância Sanitária estadual apreendeu 20 amostras de NP que estavam com suspeita de contaminação, pois pacientes que fizeram uso desse produto adquiriram infecção da corrente sanguínea.

As amostras foram encaminhadas ao INCQS em 24 de abril de 2007, todas sob modalidade fiscal. Dentre os documentos anexados ao processo estavam: documentos que descreviam a composição nutricional da NP e a lista de insumos utilizados. A notificação de contaminação foi feita pela farmácia de manipulação em 11 de abril, já que uma empresa contratada pela mesma encontrou uma contaminação nas NPs produzidas, que tinham sido encaminhadas a diversos hospitais da cidade do Rio de Janeiro.

Dentre as amostras de NP submetidas ao ensaio de esterilidade no INCQS, todas foram consideradas satisfatórias. Nos documentos consultados, a empresa afirmou, em um email enviado ao INCQS, que eles haviam identificado a bactéria como *E. agglomerans*,

presente no corante que era utilizado para verificar microfuro em ampolas. Não há dados nos processos das amostras, quanto aos métodos utilizados para identificar essa bactéria.

4.1.12.3 Surto 3

Esse surto ocorreu em data próxima ao anterior, também na cidade do Rio de Janeiro. Duas amostras (bolsa de NP) foram apreendidas pela VISA estadual e encaminhadas ao INCQS no dia 04 de junho de 2007, sob denúncia de causar óbito em paciente que fez uso do produto.

As duas amostras foram elegíveis para o ensaio de esterilidade e tiveram o seu resultado satisfatório. Nos processos documentais, constam o relatório técnico do registro do produto e metodologia de análise microbiológica utilizada, além de relatório do hospital acerca dos acontecimentos.

No relatório, o hospital aponta que o paciente fez uso de três bolsas de NP e teve choque séptico, com hemocultura positiva para *K. pneumoniae*. Entretanto, o que causou estranheza aos profissionais foi que a cepa isolada era sensível a praticamente todos os antimicrobianos testados, com exceção da ampicilina. Logo, eles sugeriram que a fonte de contaminação poderia não ser hospitalar, mas sim ambiental, visto que micro-organismos hospitalares com grande frequência apresentam resistência a diversos antimicrobianos.

No processo, não há informação se a bolsa analisada tinha a mesma composição da qual o paciente fez uso. Isso é de extrema importância porque os insumos utilizados podem não ser os mesmos.

4.1.12.4 Surto 4

Foram encaminhadas ao INCQS 85 amostras de NP em novembro de 2013. Essas amostras eram provenientes de diversos hospitais da Região Sul do Brasil. A contaminação das NPs foi descoberta quando o Hospital de Clínicas, vinculado à Universidade Federal do Paraná, e o Hospital Pequeno Príncipe, informaram que pacientes que fizeram uso das bolsas de NP tiveram complicações (DIONÍSIO, 2014). Conforme a Secretaria de Estado da Saúde (SESA), as investigações começaram após relatos de médicos desses hospitais, sobre quadros de infecção em alguns pacientes que receberam a NP. Após a notificação, a empresa suspendeu a produção e a distribuição das bolsas de NP (G1 PR, 2013). Em Curitiba, 45 pacientes receberam a NP, dos quais 15 apresentaram intercorrências (febre e piora geral do

quadro), sendo relatados três óbitos. Em outras cidades do PR, um total de 15 pacientes teve bacteremia, culminando em três óbitos: dois em Campo Largo e um em Francisco Beltrão, totalizando seis mortes no estado do Paraná (TRISOTTO; SENKOVSKI, 2013). Segundo Pillonetto et al (2018), ocorreu um total de sete óbitos no PR.

Quatro hospitais de Curitiba receberam NP da mesma farmácia de manipulação: Hospital de Clínicas, Hospital Pequeno Príncipe, Hospital do Trabalhador e Hospital Nossa Senhora do Pilar. O órgão de Vigilância Sanitária realizou inspeção na empresa e coletou amostras de NP, de insumos e de água utilizada na manutenção e limpeza dos equipamentos, além de verificar as condições de manipulação do produto (CURITIBA, 2013). De acordo com Pillonetto et al (2018), todas as amostras provenientes de equipamentos, insumos e água envolvidos no processo de manipulação de NP estavam estéreis, não sendo detectado crescimento microbiano. Além dessas ações, a Vigilância Sanitária realizou, como medida cautelar, a interdição da farmácia durante três meses, para que a sua produção ficasse suspensa até que fosse elucidada a fonte de contaminação. As bolsas produzidas pela mesma empresa foram distribuídas em seis hospitais de Curitiba e Região Metropolitana, sete hospitais do litoral e interior do Paraná, dois hospitais em Santa Catarina e dois em São Paulo.

O INCQS recebeu 85 amostras desse surto, resultando na identificação de 24 cepas, provenientes de 12 amostras contaminadas: cepas 3878 a 3905, 3909 e 3910 (Quadro 4 – item 3.2)

4.2 Identificação fenotípica das cepas

As 26 cepas foram previamente identificadas pelo Setor de Bactérias e Arqueas do INCQS por meio do sistema automatizado VITEK®2 *Compact*. Os resultados foram coletados a partir de registros presentes no caderno de análise do setor (Quadros 8, 9 e 10). Nesse estudo, após reativação das cepas, foi realizada nova caracterização fenotípica através do método de Gram (características morfotintorirais) e a identificação foi realizada por meio de diversas provas bioquímicas convencionais.

4.2.1 Cepas 3909 e 3910

As cepas 3909 e 3910 foram identificadas pelo VITEK®2 *Compact* como *R. radiobacter* e a prova do adonitol foi a única que variou nas duas cepas. A cepa 3909 foi negativa, enquanto que a cepa 3910 foi positiva para assimilação de adonitol (Quadro 8). O

perfil descrito no Quadro 08 resultou em uma identificação de 99% de probabilidade de ser *R. radiobacter* em ambas as cepas. Os biotipos de identificação fornecidos pelo equipamento para as cepas foram: 0520100200200001 e 2520100200200001.

Nesse estudo, as cepas 3909 e 3910 foram classificados como bastonetes Gram negativos, móveis, oxidase e catalase positivas. Foram avaliados também quanto ao seu metabolismo através de diversas provas bioquímicas convencionais, porém não foram consideradas as provas de assimilação de carboidratos, pois a base de fermentação preparada com indicador de Andrade não é adequada para a verificação de assimilação de carboidrato. Em relação à identificação pelo método bioquímico convencional, as cepas pertencentes à família Rhizobiaceae tiveram os resultados das provas compatíveis com a espécie *R. radiobacter* (Tabela 1), com divergência nas provas de redução do nitrato, produção de lisina descarboxilase e de arginina diidrolase, que segundo o *Manual of Clinical Microbiology* (WINN et al, 2012; FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015), são positiva, positiva e negativa em 100 % das cepas, respectivamente.

Quadro 8 - Leitura do equipamento VITEK®2 Compact para identificação* das cepas 3909 e 3910.

APPA	-	ADO	(V)	PyrA	-	IARL	+	dCEL	-	BGAL	+
H2S	-	BNAG	+	AGLTp	-	dGLU	-	GGT	-	OFF	-
BGLU	+	dMAL	-	dMAN	-	dMNE	-	BXYL	-	BAIap	-
ProA	-	LIP	-	PLE	-	TyrA	-	URE	+	dSOR	-
SAC	-	dTAG	-	dTRE	-	CIT	-	MNT	-	5KG	-
ILATk	-	AGLU	+	SUCT	-	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	-
GlyA	-	ODC	-	LDC	-	IHISa	-	CMT	-	BGUR	-
O129R	-	GGAA	-	IMLTa	-	ELLM	+	ILATa	-		

Legenda: + positivo; - negativo; (V) variável; 5KG (5-Queto-D-Gluconato); ADO (Adonitol); AGAL (Alfa-Galactosidase); AGLTp (Glutamil Arilamidase pNA); AGLU (Alfa-Glucosidase); APPA (Ala-Fe-Pro Arilamidase); BAIap (Beta-Alanina arilamidase pNA); BGAL (Beta-Galactosidase); BGLU (Beta-Glucosidase); BGUR (Beta-Glucuronidase); BNAG (Beta-N-Acetil-Glucosaminidase); BXYL (Beta-Xilosidase); CCHA (Ácido α -hidroxicinâmico); CIT (Citrato); CMT (Cumarato); dCEL (D-Celobiose); dGLU (D-glicose); dMAL (D-Maltose); dMAN (D-Manitol); dMNE (D-manose); dSOR (D-Sorbitol); dTAG (D-Tagatose); dTRE (D-Trealose); ELLM (ELLMAN); GGAA (Glu-Gli-Arg-Arilamidase); GGT (Gama-Glutamil-Transferase); GlyA (Assimilação Glicina Arilamidase); H2S (Produção de H₂S); IARL (L-Arabitol); IHISa (Assimilação L-Histidina); ILATa (Assimilação L-Lactato); ILATk (Alcalinização L-Lactato); IMLTa (Assimilação L-Malato); LDC (Lisina Descarboxilase); LIP (Lipase); MNT (Malonato); NAGA (Beta-N-Acetil-Galactosaminidase); ODC (Ornitina Descarboxilase); OFF (Fermentação/Glicose); PHOS (Fosfatase); PLE (Palatinose); ProA (L-Prolina Arilamidase); PyrA (L-Pirrolidonil-Arilamidase); SAC (Sacarose); SUCT (Alcalinização Succinato); TyrA (Tirosina Arilamidase); URE (Urease).

* Identificação realizada pelo Setor de Bactérias e Arqueas do INCQS.

Fonte: Do autor, 2018.

As cepas pertencentes à família Rhizobiaceae tiveram a sua identificação prejudicada devido a não realização das provas bioquímicas de fermentação e/ou assimilação de carboidratos, que seriam úteis para verificar se essas características estariam de acordo com a espécie *R. radiobacter*.

Tabela 1 - Resultado das provas bioquímicas convencionais realizadas para as cepas 3909 e 3910, identificados como *Rhizobium radiobacter*.

Provas Bioquímicas	3909 e 3910
OF glicose	O ^a
Agar Esculina	+
Caldo VP	-
Caldo VM-VP	-
SIM – motilidade	+
SIM - H ₂ S	-
SIM – Indol	-
Descarboxilase Lisina	-
Hidrolase Arginina	+
Descarboxilase Ornitina	-
Utilização de Malonato	-
Utilização de Citrato	-
Hidrólise da Ureia	+
Fenilalanina	+
Nitrato	-
Gelatinase	-
Oxidase	+
Catalase	+
Produção de DNase	+*

Legenda: *provas com resultado após mais de 24 horas de incubação; ^a reação fraca em mais de 24 horas; + positivo; - negativo; O: metabolismo oxidativo. Em todas as provas, as cepas apresentaram o mesmo resultado. Fonte: Do autor, 2018.

4.2.2 Cepas 3379, 3381 e 3878 a 3905

As 22 cepas do grupo 3878 a 3905 apresentaram um perfil de identificação pelo VITEK®2 Compact, conforme o Quadro 9, no qual 20 cepas foram identificadas como *Pantoea* spp. e dois (3890 e 3892), como *K. intermedia*. Esse perfil resultou em uma identificação de 85 a 89% de probabilidade de ser *Pantoea* spp., e 93% de probabilidade de ser *K. intermedia*. As provas que variaram entre as cepas foram: L-prolina arilamidase (ProA), Beta-N-Acetil-Galactosaminidase (NAGA) e assimilação de L-Malato (IMLTa).

Quadro 9 - Leitura do equipamento VITEK®2 Compact para identificação* das cepas 3878 a 3905 (n=22).

APPA	-	ADO	-	PyrA	-	IARL	-	dCEL	+	BGAL	+
H2S	-	BNAG	-	AGLTp	-	dGLU	+	GGT	+	OFF	+
BGLU	+	dMAL	+	dMAN	+	dMNE	+	BXYL	+	BAIap	-
ProA	(V)	LIP	-	PLE	+	TyrA	+	URE	-	dSOR	+
SAC	+	dTAG	-	dTRE	+	CIT	+	MNT	+	5KG	+
ILATk	+	AGLU	-	SUCT	+	NAGA	(V)	AGAL	-	PHOS	-
GlyA	(V)	ODC	-	LDC	-	IHISa	-	CMT	-	BGUR	(V)
O129R	+	GGAA	-	IMLTa	(V)	ELLM	+	ILATa	-		

Legenda: + positivo; - negativo; (V) variável; 5KG (5-Queto-D-Gluconato); ADO (Adonitol); AGAL (Alfa-Galactosidase); AGLTp (Glutamil Arilamidase pNA); AGLU (Alfa-Glucosidase); APPA (Ala-Fe-Pro Arilamidase); BAIap (Beta-Alanina arilamidase pNA); BGAL (Beta-Galactosidase); BGLU (Beta-Glucosidase); BGUR (Beta-Glucoronidase); BNAG (Beta-N-Acetil-Glucosaminidase); BXYL (Beta-Xilosidase); CCHA (Ácido α -hidroxicinâmico); CIT (Citrato); CMT (Cumarato); dCEL (D-Celobiose); dGLU (D-glicose); dMAL (D-Maltose); dMAN (D-Manitol); dMNE (D-manose); dSOR (D-Sorbitol); dTAG (D-Tagatose); dTRE (D-Trealose); ELLM (ELLMAN); GGAA (Glu-Gli-Arg-Arilamidase); GGT (Gama-Glutamil-Transferase); GlyA (Assimilação Glicina Arilamidase); H2S (Produção de H₂S); IARL (L-Arabitol); IHISa (Assimilação L-Histidina); ILATa (Assimilação L-Lactato); ILATk (Alcalinização L-Lactato); IMLTa (Assimilação L-Malato); LDC (Lisina Descarboxilase); LIP (Lipase); MNT (Malonato); NAGA (Beta-N-Acetil-Galactosaminidase); ODC (Ornitina Descarboxilase); OFF (Fermentação/Glicose); PHOS (Fosfatase); PLE (Palatinose); ProA (L-Prolina Arilamidase); PyrA (L-Pirrolidonil-Arilamidase); SAC (Sacarose); SUCT (Alcalinização Succinato); TyrA (Tirosina Arilamidase); URE (Urease).

*Identificação realizada pelo Setor de Bactérias e Arqueas do INCQS.

Fonte: Do autor, 2018.

As cepas identificadas como *K. intermedia* (3890 e 3892) tiveram um biotipo no VITEK®2 Compact cadastrados como 0605734557500011 e os outras cepas *Pantoea* spp., como: 0607735557500051 (3898); 0607734557510051 (3893 e 3899); e 0607734557500051 (3878, 3879, 3880, 3881, 3888, 3889, 3891, 3894, 3895, 3896, 3897, 3900, 3901, 3902, 3903, 3904, 3905).

Sete cepas (3891, 3893, 3898, 3899, 3902, 3903, 3905) apresentaram reação fracamente positiva para beta-N-acetil-galactosaminidase, um com reação fraca para assimilação de glicina arilamidase (3880), um positivo (3898) e dois (3888 e 3899) fracamente positivos para L-prolina, cinco (3878, 3879, 3889, 3897, 3901) com reação fracamente positiva para beta-glucoronidase e dois (3890 e 3892) com reação positiva para assimilação de L-malato.

O banco de dados do equipamento VITEK®2 Compact possui *P. agglomerans* e *Pantoea* spp. Como as características fenotípicas não se enquadravam na espécie citada, as cepas foram identificadas apenas como gênero, baseado principalmente na característica da *Pantoea* por ser um dos poucos gêneros da família Enterobacteriaceae que apresentam resultados negativos para ornitina e lisina descarboxilase, e arginina diidrolase (FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015). Porém, algumas provas do equipamento contradizem o gênero: L-

Pirrolidonil-Arilamidase (PyrA), que deveria ser positiva; e ELLMAN (ELLM), 5-Queto-D-Gluconato (5KG) e Palatinose (PLE), que deveriam ser negativos.

As cepas 3379 e 3381 apresentaram o resultado do VITEK®2 *Compact* conforme o Quadro 10, não tendo variação das provas bioquímicas convencionais entre ambos. O perfil bioquímico, de acordo com o equipamento, era mais compatível com a espécie *E. cloacae* subsp. *cloacae*, porém o resultado das provas de D-sorbitol (dSOR), 5KG e ornitina descarboxilase (ODC) contradiziam o perfil biológico típico dessa bactéria. Esse perfil bioquímico pelo VITEK®2 *Compact* resultou em uma identificação de 91% de probabilidade de ser *E. cloacae* subsp. *cloacae*.

Quadro 10 - Leitura do equipamento VITEK®2 *Compact* para identificação* das cepas 3379 e 3381.

APPA	-	ADO	-	PyrA	-	IARL	-	dCEL	+	BGAL	+
H2S	-	BNAG	+	AGLTp	-	dGLU	+	GGT	+	OFF	+
BGLU	+	dMAL	+	dMAN	+	dMNE	+	BXYL	+	BAIap	-
ProA	+	LIP	-	PLE	+	TyrA	+	URE	-	dSOR	+
SAC	+	dTAG	-	dTRE	+	CIT	+	MNT	+	5KG	+
ILATk	+	AGLU	-	SUCT	+	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	+
GlyA	+	ODC	-	LDC	-	IHISa	-	CMT	-	BGUR	-
O129R	+	GGAA	-	IMLTa	-	ELLM	-	ILATa	-		

Legenda: + positivo; - negativo; 5KG (5-Queto-D-Gluconato); ADO (Adonitol); AGAL (Alfa-Galactosidase); AGLTp (Glutamil Arilamidase pNA); AGLU (Alfa-Glucosidase); APPA (Ala-Fe-Pro Arilamidase); BAIap (Beta-Alanina arilamidase pNA); BGAL (Beta-Galactosidase); BGLU (Beta-Glucosidase); BGUR (Beta-Glucoronidase); BNAG (Beta-N-Acetil-Glucosaminidase); BXYL (Beta-Xilosidase); CCHA (Ácido α -hidroxicinâmico); CIT (Citrato); CMT (Cumarato); dCEL (D-Celobiose); dGLU (D-glicose); dMAL (D-Maltose); dMAN (D-Manitol); dMNE (D-manose); dSOR (D-Sorbitol); dTAG (D-Tagatose); dTRE (D-Trealose); ELLM (ELLMAN); GGAA (Glu-Gli-Arg-Arilamidase); GGT (Gama-Glutamil-Transferase); GlyA (Assimilação Glicina Arilamidase); H2S (Produção de H₂S); IARL (L-Arabitol); IHISa (Assimilação L-Histidina); ILATa (Assimilação L-Lactato); ILATk (Alcalinização L-Lactato); IMLTa (Assimilação L-Malato); LDC (Lisina Descarboxilase); LIP (Lipase); MNT (Malonato); NAGA (Beta-N-Acetil-Galactosaminidase); ODC (Ornitina Descarboxilase); OFF (Fermentação/Glicose); PHOS (Fosfatase); PLE (Palatinose); ProA (L-Prolina Arilamidase); PyrA (L-Pirrolidonil-Arilamidase); SAC (Sacarose); SUCT (Alcalinização Succinato); TyrA (Tirosina Arilamidase); URE (Urease).

*Identificação realizada pelo Setor de Bactérias e Arqueas do INCQS.

Fonte: Do autor, 2018.

Apenas com o resultado do VITEK®2 *Compact*, não foi possível definir as espécies bacterianas envolvidas nos surtos de 2005 e de 2013.

Nesse estudo foram realizados ensaios fenotípicos convencionais em 24 cepas. Estas foram caracterizadas como bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, móveis, oxidase negativos, com metabolismo oxidativo e fermentativo, pertencentes à família Enterobacteriaceae. As 22 enterobactérias, isoladas de amostras relacionadas ao surto ocorrido em 2013 (3878, 3879, 3880, 3881, 3888, 3889, 3890, 3891, 3892, 3893, 3894, 3895, 3896, 3897, 3898, 3899, 3900, 3901, 3902, 3903, 3904, 3905), apresentaram os mesmos resultados para as provas bioquímicas convencionais empregadas, conforme Tabela 2. As cepas com

numeração entre 3878 e 3905 foram identificadas como pertencentes ao complexo *E. agglomerans*, e as cepas 3379 e 3381, como complexo *E. cloacae*.

Tabela 2 - Resultado das provas bioquímicas convencionais realizadas nas 24 cepas.

Provas Bioquímicas Convencionais	Cepas		
	3878 a 3905	3379	3381
OF glicose	O/F	O/F	O/F
Agar Esculina	+	+	+
Caldo VP	+	+	+
Caldo VM-VP	+	+	+
SIM – motilidade	+	+	+
SIM - H ₂ S	-	-	-
SIM – Indol	+	-	-
Descarboxilase Lisina	-	-	-
Hidrolase Arginina	-	+*	+
Descarboxilase Ornitina	-	-	-
Utilização de Malonato	+	+	+
Utilização de Citrato	+	+	+
Hidrólise da Ureia	-	-	-
Fenilalanina	+ ^a	-	-
Nitrato	+	+ ^a	+
Gelatinase	+ ^b	+ ^b	+ ^b
Oxidase	-	-	-
Catalase	+	+	+
Produção de DNase	+*	+*	+*
Fermentação:			
Glicose com Duhan	+	-	+
Adonitol	-	-	-
Arabinose	+	+	+
Frutose	+	+	+
Lactose	+	+*	+*
Maltose	+	+	+
Manitol	+	+	+
Manose	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Melzitose	-	-	-
Ramnose	+	+	+
Sacarose	+	+	+
Trealose	+	+	+
Xilose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Rafinose	+	+	+
Salicina	+	+	+
Eritritol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Dulcitol	+	+	+
MGP	+*	+*	+*
Trealose	+	+	+

Legenda: *provas com resultado após 48 horas de incubação; + positivo; MGP: metil- α -D-glicopiranosídeo.
Fonte: Do autor, 2018.

A identificação feita pelo sistema automatizado VITEK®2 *Compact* sugeria que as cepas seriam pertencentes ao gênero *Pantoea* e espécie *K. intermedia*, conforme o Quadro 09. Porém, na classificação feita com base nas provas bioquímicas convencionais, verificou-se que as cepas não se enquadravam em nenhum dos gêneros da família Enterobacteriaceae descritos nos manuais consultados (BERGEY'S..., 2005b; FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015), se aproximando do complexo *E. agglomerans*.

Outras duas enterobactérias, provenientes de NP envolvidas no caso de óbito de três recém-nascidos em 2005 (3379 e 3381), apresentaram resultados semelhantes entre elas nas provas bioquímicas convencionais, divergindo na produção de gás a partir de D-glicose e na capacidade de redução de nitrato a nitrito, que foi mais fraca na cepa 3379. A cepa 3379 produziu metabólitos que alteraram a coloração do meio de cultura, porém não foi observada a produção de gás. A reação de redução do nitrato a nitrito foi positiva em ambas as cepas, mas com menos intensidade na cepa 3379. A prova de produção da gelatinase também foi positiva após 28 dias de incubação a 25°C, como descrito na Tabela 2. A fermentação de metil- α -D-glicopiranosídeo (MGP) e lactose em ambas foi mais lenta do que o padrão apresentado para os outros açúcares, sendo positiva em 48 horas. A cepa 3379 foi positiva tardio para a produção de arginina diidrolase, sendo visualizada após 96 horas de incubação.

Assim como o grupo anterior das cepas, essas bactérias não foram identificadas através das provas bioquímicas convencionais realizadas, se aproximando da espécie *E. cloacae*. Algumas provas que divergiram, segundo o Manual Bergey's (2005b), foram: arginina diidrolase e ornitina descarboxilase; e de acordo com o *Manual of Clinical Microbiology* (FORSYTHE; ABBPTT; PITOUT, 2015), as provas que não apresentaram o mesmo perfil foram: fermentação da lactose e melibiose, pois tem um elevado percentual de cepas que são positivas, 93% e 90%, respectivamente. Nas referências consultadas, diversas provas bioquímicas convencionais possuem resultado variável entre cepas dos complexos *E. cloacae* e *E. agglomerans*, dificultando ainda mais a identificação.

4.3 Identificação proteômica por MALDI-TOF MS

A identificação feita pela espectrofotometria de massa em MALDI-TOF identificou apenas duas das 26 cepas a nível de espécie. As cepas 3909 e 3910 foram identificados com 99,9% de confiança como pertencentes à espécie *R. radiobacter*, que está em conformidade com o resultado obtido pelo VITEK®2 *Compact*. As outras 24 cepas pertencentes à família Enterobacteriaceae não foram identificadas, e nove apresentaram *show detail*, com algumas

opções de possível identificação ou similaridade no perfil de proteínas identificado (Quadro 11).

Quadro 11 - Resultado do *show detail* com algumas opções de possível identificação ou similaridade no perfil de proteínas identificado com base na análise por MALDI-TOF MS para as cepas identificadas como pertencentes aos complexos *E. agglomerans* e *E. cloacae* pelas provas bioquímicas convencionais.

Cepa	Número total de picos de proteínas	Número de picos em comum	Percentual de similaridade (%)
3879	126	126	100
<i>E. coli</i> DSM 5923_02	163	45	42,90
3880	105	105	100
<i>E. coli</i> DSM 5923_02	163	51	40,50
3889	128	128	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	137	54	42,20
3893	126	126	100
<i>E. coli</i> NCTC 1106	155	52	41,30
<i>E. coli</i> DSM 5923_02	163	52	41,30
<i>E. aerogenes</i>	137	51	40,50
3894	123	123	100
<i>E. coli</i> DSM 5923_02	163	50	40,70
3895	142	142	100
<i>E. aerogenes</i>	137	59	41,50
3896	128	128	100
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	165	53	41,40
3897	123	123	100
<i>E. aerogenes</i>	137	59	41,50
<i>Shigella Flexneri</i>	157	50	40,70
3903	107	107	100
<i>E. aerogenes</i>	137	43	41,50
<i>S. flexneri</i>	167	44	40,70
<i>E. coli</i> DSM 5923_02	163	45	40,70
<i>Shigella sonnei</i>	175	43	40,20

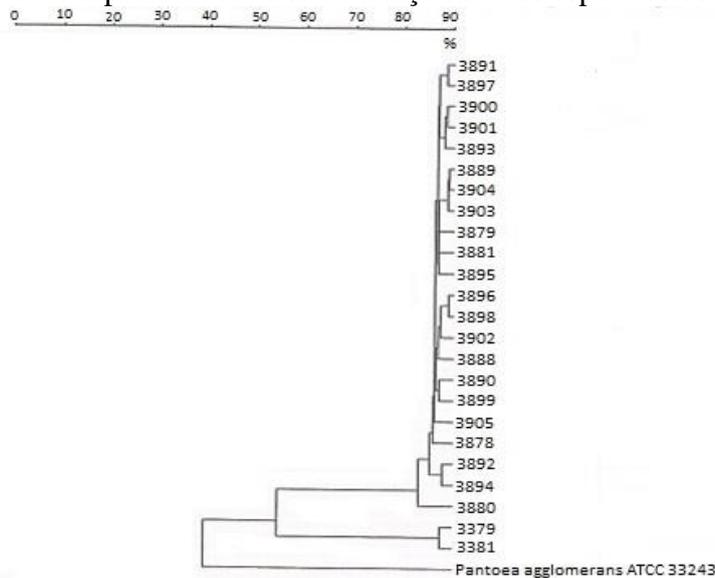
Legenda: *E. coli*: *Escherichia coli*; *E. aerogenes*: *Enterobacter aerogenes*.

Fonte: Do autor, 2018.

A partir dos picos obtidos na análise por MALDI-TOF MS, o *software* elaborou um dendrograma (Figura 11), demonstrando a proximidade entre as cepas com base nas proteínas detectadas no espectrômetro de massa, permitindo a visualização de semelhança entre os perfis de espectros (CARANNANTE *et al.*, 2015). Na Figura 11, observa-se um grupo I formado pelas cepas 3878, 3879, 3880, 3881, 3888, 3889, 3890, 3891, 3891, 3892, 3893, 3894, 3895, 3896, 3897, 3898, 3899, 3900, 3901, 3902, 3903, 3904, e 3905. Esse grupo possui um percentual de semelhança dos espectros, entre si, em torno de 85 a 90%. Os espectros do grupo II, formado pelas cepas 3379 e 3381, são diferenciados do grupo I em torno de 50%.

P. agglomerans ATCC 33243 também foi analisada por MALDI-TOF MS para comparar a sua identificação com as cepas que foram identificadas como *Pantoea* spp. pelo VITEK®2 Compact. Na Figura 11, é possível observar que a *P. agglomerans* se diferencia totalmente do grupo I, com uma porcentagem de semelhança entre os espectros de aproximadamente 35%. Isso reforçou a possibilidade do grupo I não fazer parte do gênero *Pantoea* spp.

Figura 11- Dendrograma elaborado pelo *software* interno do equipamento VITEK®MS RUO, considerando o percentual de semelhança entre os espectros obtidos.



Legenda: Grupo I: 3878 a 3905; Grupo II: 3379 e 3381
Fonte: Do autor, 2018.

Com base nisso, todas as cepas da família Enterobacteriaceae e as duas cepas de *R. radiobacter* tiveram o gene *rrs* sequenciado e 14 cepas do grupo I e as duas cepas do grupo II foram submetidas ao MLSA, com sequenciamento de quatro genes *housekeeping*.

4.4 Identificação genotípica das cepas

A análise do gene *rrs* foi realizada para todas as 26 cepas. Outros quatro genes foram analisados para 16 cepas.

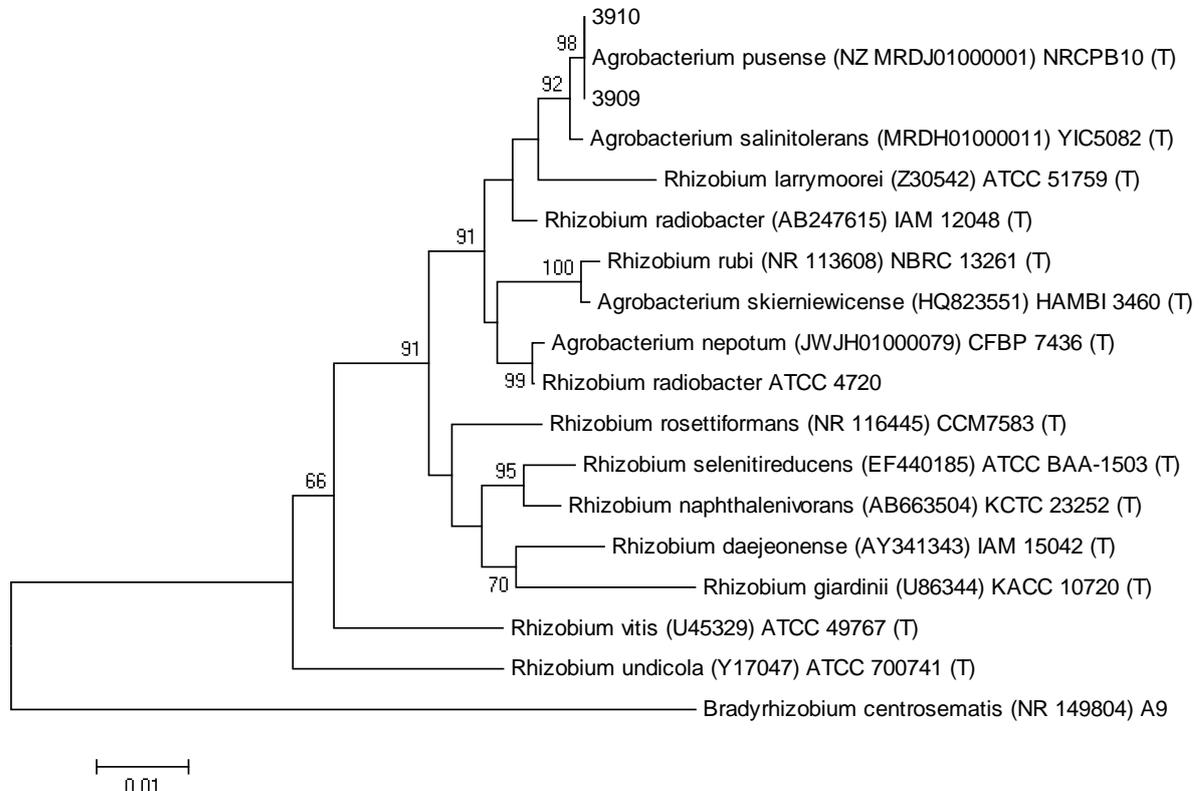
4.4.1 Análise da sequência do gene *rrs*

4.4.1.1 Cepas bacterianas 3909 e 3910

O gene *rrs* dessas cepas foi sequenciado em um tamanho de 1.427 pb (3909) e 1.421 pb (3910). Quando as sequências foram submetidas ao banco de dados EZBioCloud (YOON et al, 2017), as cepas 3909 e 3910 foram identificadas como: *Rhizobium pusense*, com 100% de identidade; *Agrobacterium salinitolerans*, com 99,72 % de identidade, *R. radiobacter*, com 99,15 % de identidade, quando comparados 1.406 pb.

A confirmação da existência dessas espécies foi consultada no site LSNP (PARTE, 2018) e depois foi calculada a similaridade com as espécies tipo mais próximas, utilizando o BLASTn. As cepas apresentaram os seguintes resultados: *A. pusense*, com 99,93 % de similaridade; *A. salinitolerans*, com 99,64 % de similaridade, *R. radiobacter*, com 99,08 % de similaridade.

Figura 12 - Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene *rrs*. A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A sequência do gene *rrs* da espécie *Bradyrhizobium centrosematis* foi utilizada como “out group”.



Fonte: Do autor, 2018.

Com base nas sequências do gene *rrs*, foi elaborada uma árvore filogenética (Figura 12) utilizando as sequências das cepas 3909 e 3910, a cepa de referência *R. radiobacter* ATCC 4720 e sequências de espécies tipo próximas depositadas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). A análise filogenética do gene *rrs* mostrou que as cepas 3909 e 3910, devem pertencer à espécie *A. pusense* (Figura 12).

4.4.1.2 Cepas bacterianas 3379, 3381 e 3878 a 3905

As cepas com numeração 3379, 3381 e 3878 a 3905 tiveram a sequência do gene *rrs* submetidas ao banco de dados EzBioCloud, conforme mostra a Tabela 3. As sequências das bactérias 3878 a 3905 apresentaram 99,71% de identidade com a cepa tipo de *P. diazotrophicus*, e 99,04% com a de *Phytobacter ursingii*. As cepas 3379 e 3381 apresentaram as seguintes porcentagens de identidade na base de dados: 99,73% com *Kosakonia oryzae*, 99,59% com *Kosakonia radicincitans*, 99,52% com *Kosakonia arachidis* e 99,07% com *Kosakonia oryziphila*. A análise realizada não diferenciou as espécies das cepas avaliadas.

Tabela 3 - Identificação das cepas de enterobactérias feita na base de dados EzBioCloud, com comparação entre sequências do gene *rrs*.

Cepa	Identificação	Identidade	Total de alinhamento entre as sequências	Número de nucleotídeos diferentes
3878 a 3905	<i>P. diazotrophicus</i>	99,71 %	1.373 de 1.415 pb	4 pb
	<i>P. ursingii</i>	99,04%	1.358 de 1.415 pb	13 pb
3379 e 3381	<i>K. oryzae</i>	99,73%	1.461 de 1.484 pb	4 pb
	<i>K. radicincitans</i>	99,59%	1.461 de 1.484 pb	6 pb
	<i>K. arachidis</i>	99,52%	1.461 de 1.484 pb	7 pb
	<i>K. oryziphila</i>	99,07%	1.396 de 1.484 pb	13 pb

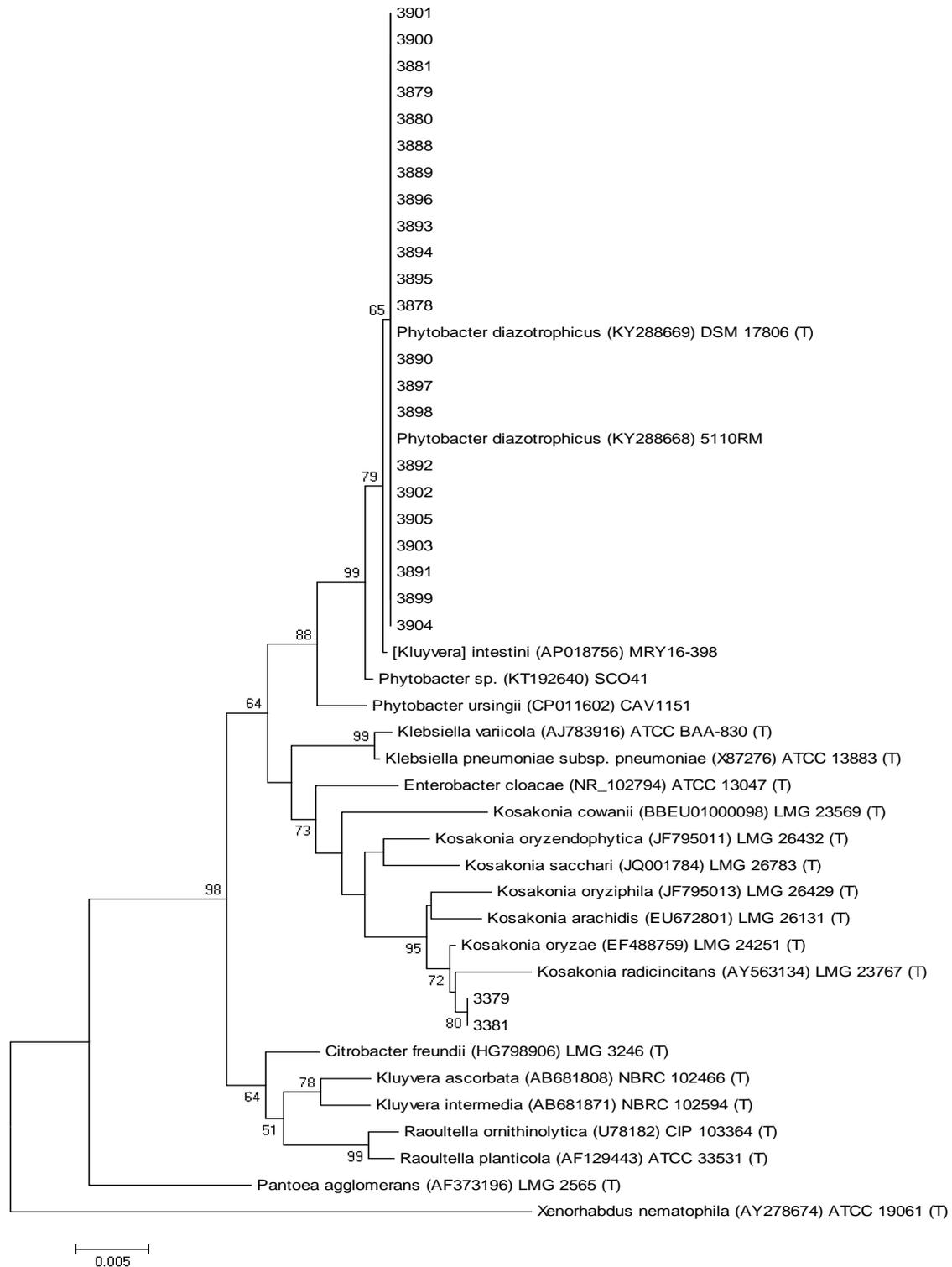
Legenda: pb: pares de base; K.: *Kosakonia*; P: *Phytobacter*.

Fonte: Do autor, 2018.

Para a análise filogenética das cepas acima citadas, com base na sequência do gene *rrs*, foram incluídas sequências de espécies tipo pertencentes a diferentes gêneros da família Enterobacteriaceae por apresentarem relacionamento filogenético (Figura 13). Nesta análise é possível observar que as cepas identificadas como *Pantoea* spp. e *K. intermédia* pelo VITEK®2 Compact estão localizados no mesmo ramo da cepa tipo de *P. diazotrophicus* e agrupadas no *clade* pertencente ao mesmo gênero. Isso sugere a identificação das cepas 3878 a 3905 como *P. diazotrophicus*. Já as cepas 3379 e 3381, apesar de demonstrarem alta similaridade no EzBioCloud com três diferentes espécies de *Kosakonia*, na árvore filogenética elas aparecem no mesmo *clade*, porém, em ramos diferentes das sete espécies descritas desse gênero.

A sequência do gene *rrs* da cepa 5110RM de *P. diazotrophicus*, identificada por Pillonetto et al (2018) de uma NP envolvida no mesmo surto ocorrido no Paraná em 2013, foi incluída na análise. A cepa tipo da espécie *P. agglomerans* também foi inserida na análise para demonstrar que esse gênero é bem diferenciado geneticamente de *Phytobacter*.

Figura 13 - Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene *rrs*. A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A sequência do gene *rrs* da espécie *Xenorhabdus nematophila* foi utilizada como “out group”.



Fonte: Do autor, 2018.

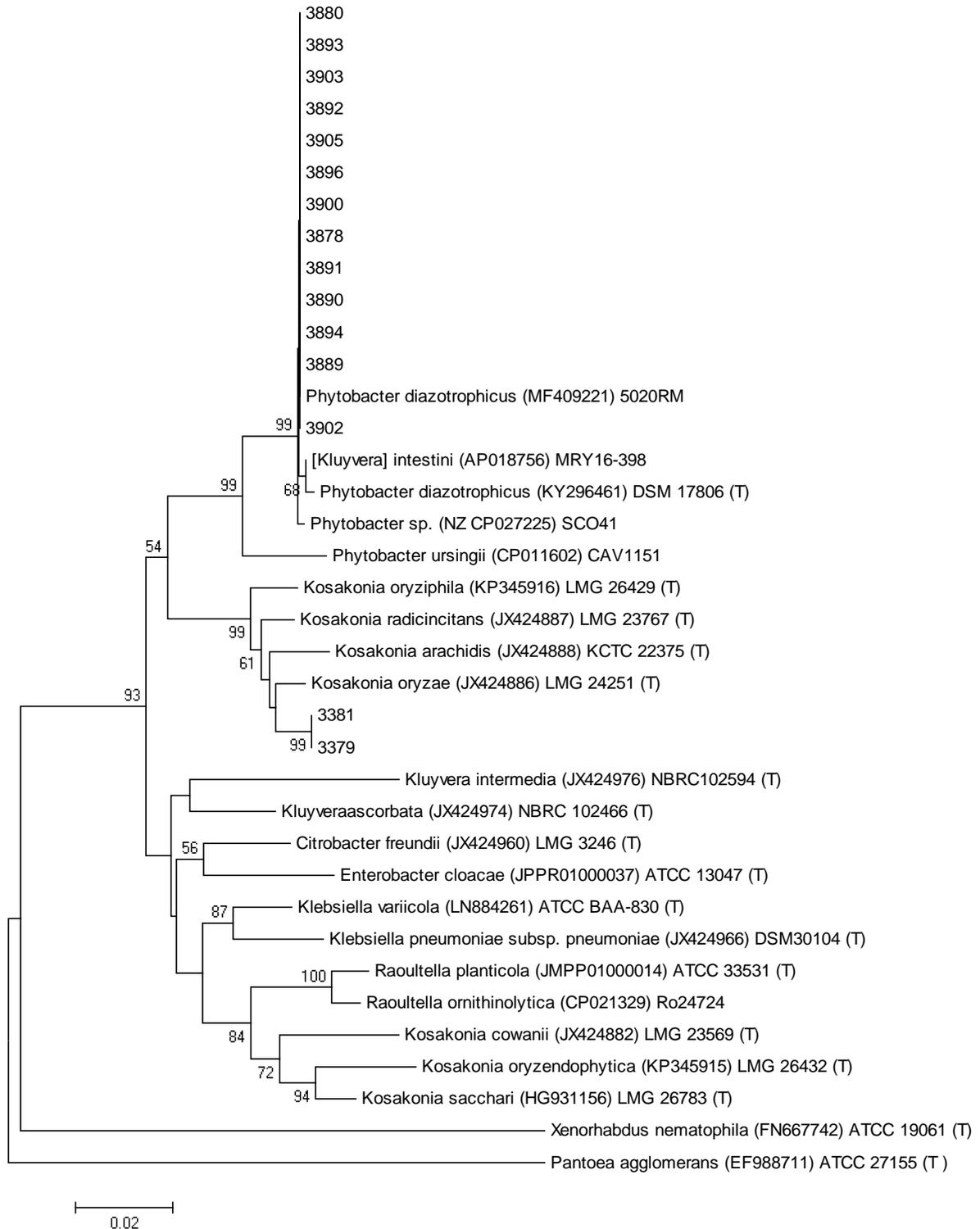
4.4.2 Multilocus sequence analysis (MLSA)

A fim de se confirmar a identificação das cepas de *P. diazotrophicus* e para elucidar a espécie das cepas de *Kosakonia*, a técnica de MLSA foi realizada utilizando a amplificação e sequenciamento dos genes *atpD*, *gyrB*, *infB* e *rpoB*. Além da análise dos genes concatenados, foram realizadas análises individuais de cada gene (Figuras 14, 15, 16, 17, 18). Uma cepa (3881) foi excluída da análise do gene *atpD* e dos genes concatenados, devido ao tamanho pequeno de sua sequência, o que diminuiria a qualidade da análise. Essa técnica confirmou a identificação das 22 cepas (3878 a 3905) como *P. diazotrophicus*.

Todos os genes sequenciados foram satisfatórios para separar as espécies *P. diazotrophicus* e *P. ursingii*. Porém, na árvore do gene *rpoB*, o *P. ursingii* não ficou agrupado com a espécie *P. diazotrophicus*, pois essa região do referido gene mostrou maior similaridade com o gênero *Raoultella* (Figura 17). No caso do gênero *Kosakonia*, todos os genes foram capazes de diferenciar as sete espécies, porém a região analisada para o gene *atpD* não se mostrou adequado para análise filogenética desse gênero, uma vez que as espécies não ficaram agrupadas na árvore filogenética. Esse gene, quando usado para comparar cepas de *P. diazotrophicus*, mostrou que os mesmos possuem pouca variação entre as sequências, mas se diferenciam da espécie *P. ursingii*.

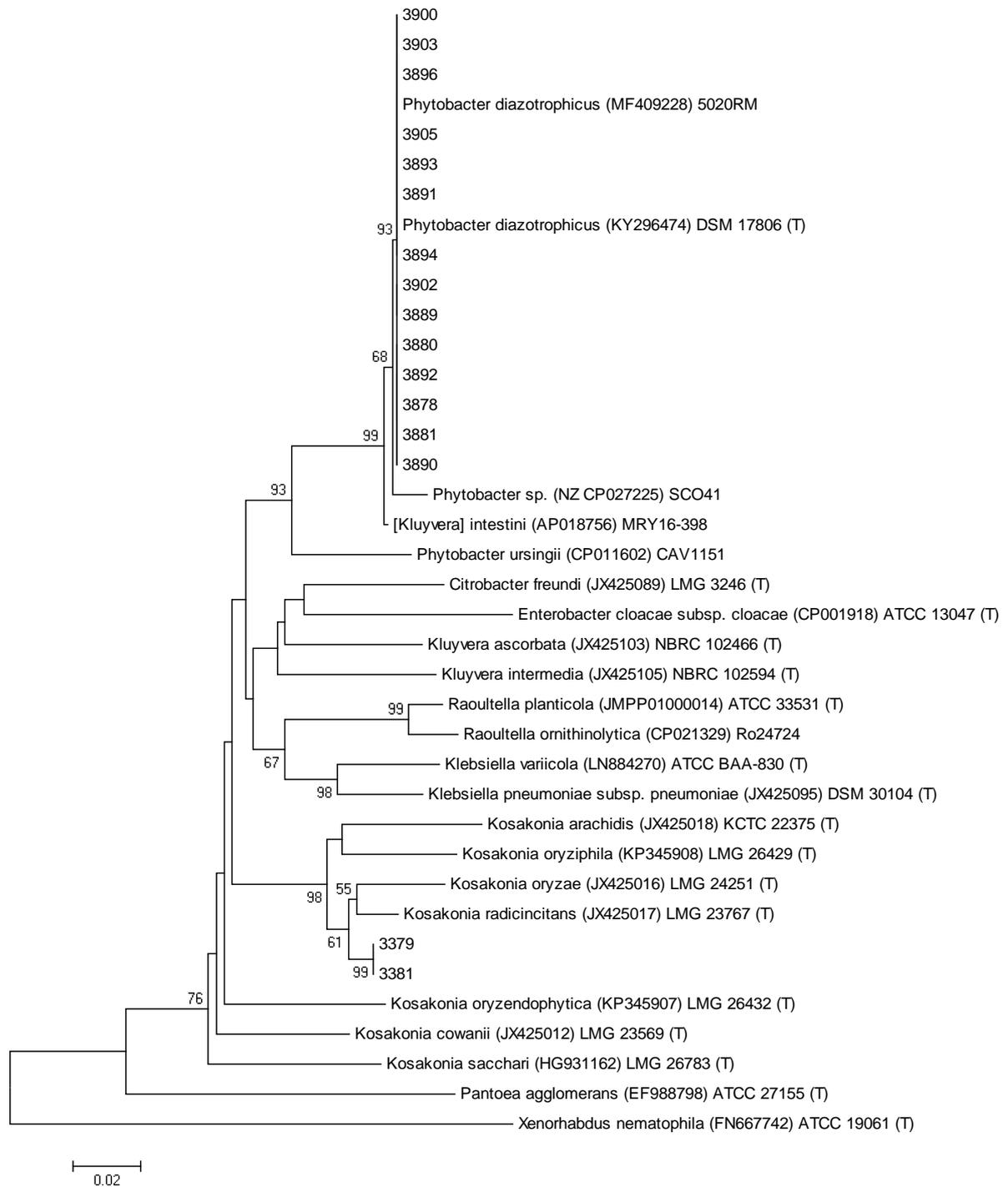
Os genes das cepas *P. diazotrophicus* 5020RM, [*Kluyvera*] *intestini* MRY 16-398 e *Phytobacter* spp. SCO41 foram incluídos nas análises após uma consulta no BLASTn, uma vez que foi verificado que as sequências das cepas 3878 a 3905 tinham uma alta similaridade (acima de 99%) com elas. A cepa *P. diazotrophicus* 5020RM também foi isolada por Pillonetto et al (2018), de amostras de hemocultura de um paciente que recebeu NP contaminada. No trabalho publicado, as cepas 5020RM e 5110RM formam um grupo monofilético, nos quais os autores afirmam se tratar de um mesmo clone. A cepa 5020RM forma um grupo monofilético com todas as outras cepas de *P. diazotrophicus* (referentes ao atual estudo) em todas as árvores construídas, uma vez que apresentaram similaridade de 100% entre si.

Figura 14 - Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene *atpD*. A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie *Xenorhabdus nematophila* foi utilizada como “out group”. Soma do comprimento do ramo = 0.63310711. Tamanho total do conjunto de dados: 603 pb.



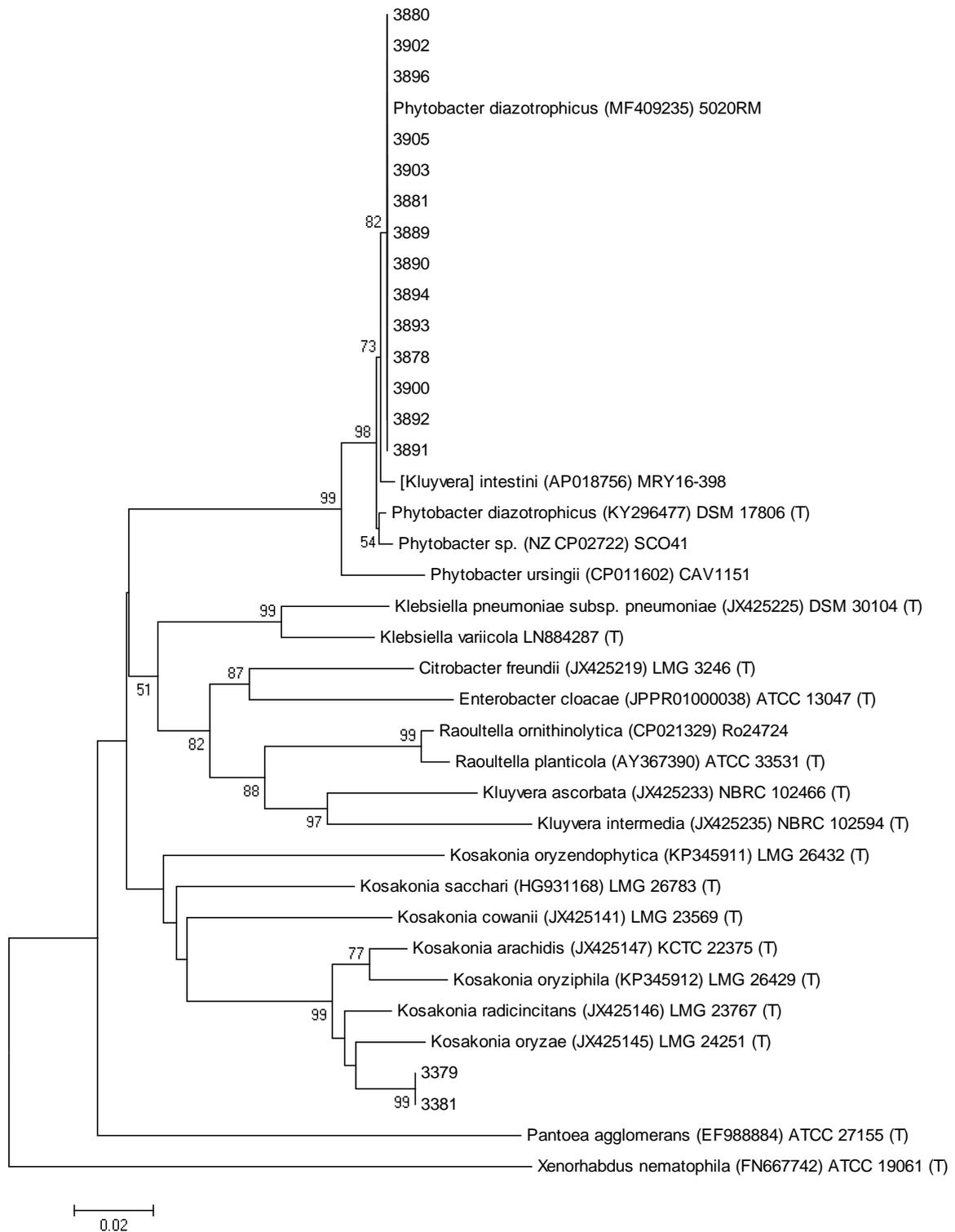
Fonte: Do autor, 2018.

Figura 15 - Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene *gyrB*. A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie *Xenorhabdus nematophila* foi utilizada como “out group”. Soma do comprimento do ramo = 1.05442831. Tamanho total do conjunto de dados: 624 pb.



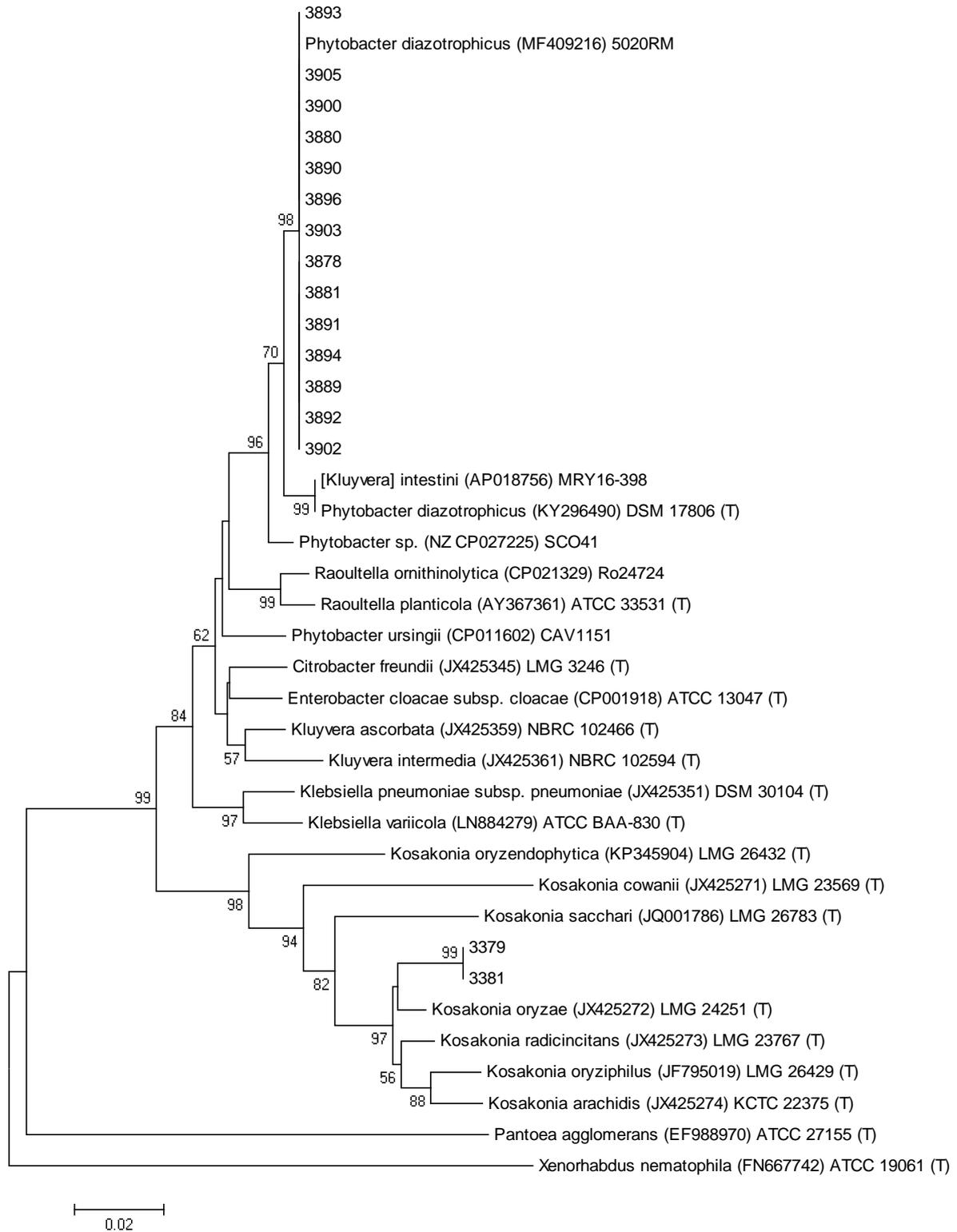
Fonte: Do autor, 2018.

Figura 16 - Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene *infB*. A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie *Xenorhabdus nematophila* foi utilizada como “out group”. Soma do comprimento do ramo = 1.04646162. Tamanho total do conjunto de dados: 598 pb.



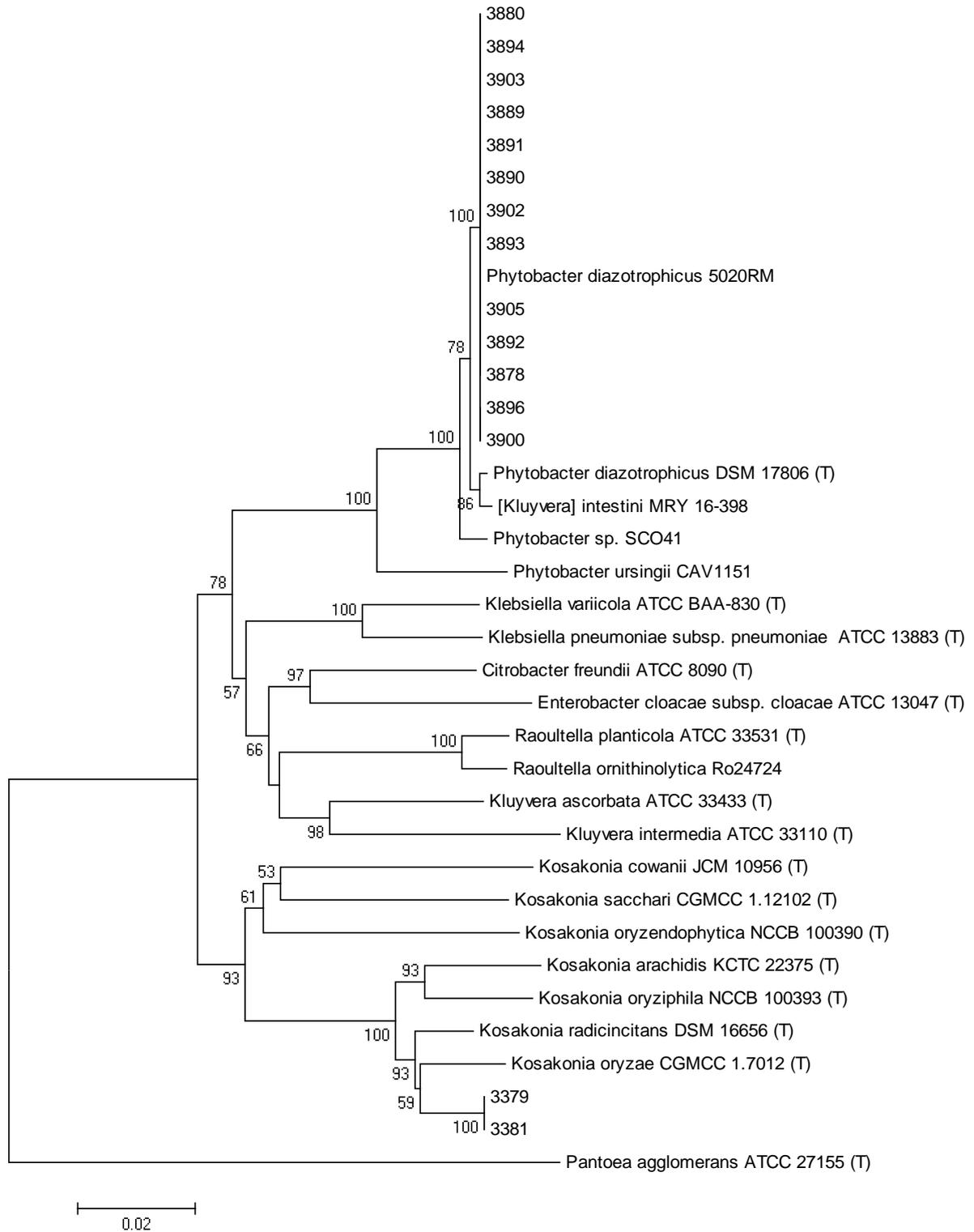
Fonte: Do autor, 2018.

Figura 17 - Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências do gene *rpoB*. A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie *Xenorhabdus nematophila* foi utilizada como “out group”. Soma do comprimento do ramo = 0.65966452. Tamanho total do conjunto de dados: 582 pb.



Fonte: Do autor, 2018.

Figura 18 - Árvore filogenética baseada no método Neighbor-Joining usando sequências concatenadas dos genes *atpD*, *gyrB*, *infB* e *rpoB*. A distância evolutiva foi calculada usando o método Kimura dois parâmetros. As porcentagens de bootstrap após 1.000 réplicas são mostradas. A espécie *P. agglomerans* foi utilizada como “out group”. Soma do comprimento do ramo = 0.71595661. Tamanho total do conjunto de dados: 2407 pb.



Fonte: Do autor, 2018.

Além das espécies presentes na Figura 18, existe ainda uma espécie, *Kosakonia pseudosacchari*, que foi proposta em 2016 por Kämpfer et al, mas que até o presente momento não foram encontrados dados de que tenha sido validada.

Na Figura 18 observa-se que a cepa [*Kluyvera*] *intestini* MRY-16-396 está agrupada com a cepa tipo de *P. diazotrophicus*, podendo considerá-la pertencente a essa espécie. A cepa *Phytobacter* spp. SCO41, apesar de estar próxima a essa espécie, ficou separada da cepa tipo DSM 17086 apoiado em um valor de *bootstrap* de 100%, não sendo possível afirmar que seja uma outra cepa de *P. diazotrophicus* ou uma espécie nova do gênero *Phytobacter*.

Na Tabela 4 encontra-se o resultado da identificação por cepa, de acordo com os métodos utilizados.

4.5 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Cepas provenientes das amostras de NP foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos frente aos antimicrobianos mais utilizados na prática médica. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 4. As cepas mostraram-se sensíveis a todos os antimicrobianos, com exceção de ampicilina, cloranfenicol e trimetopim-sulfametoxazol. As cepas identificadas como *P. diazotrophicus* e de *A. pusense* apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados, inclusive frente ao cloranfenicol e trimetopim-sulfametoxazol. As cepas identificadas como *Kosakonia* spp. possuem resistência à ampicilina.

Tabela 4 - Resultado da identificação, de acordo com os métodos utilizados, e do teste de susceptibilidade à antimicrobianos por cepa estudada.

Evento	Cepas	VITEK®2 <i>Compact</i>	Provas Bioquímicas Convencionais	MALDI-TOF MS	Sequenciamento <i>rrs</i>	MLSA	Perfil de resistência
Surto 1	3379	“Complexo <i>E. cloacae</i> ”	“Complexo <i>E. cloacae</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>Kosakonia</i> spp	<i>Kosakonia</i> spp	Amp
	3381	“Complexo <i>E. cloacae</i> ”	“Complexo <i>E. cloacae</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>Kosakonia</i> spp	<i>Kosakonia</i> spp	Amp
	3878	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3879	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	NE	Clor; Tri-sulfa
	3880	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3881	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3888	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	NE	Clor; Tri-sulfa
	3889	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3890	<i>K. intermedia</i>	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3891	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3892	<i>K. intermedia</i>	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3893	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
Surto 4	3894	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3895	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	NE	Clor; Tri-sulfa
	3896	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3897	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	NE	Clor; Tri-sulfa
	3898	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	NE	Clor; Tri-sulfa
	3899	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	NE	Clor; Tri-sulfa
	3900	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3901	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	NE	Clor; Tri-sulfa
	3902	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3903	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
	3904	<i>Pantoea</i> spp.	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	NE	Clor; Tri-sulfa

Legenda: NE: Não Executado; MLSA: *Multilocus Sequence Analysis*; *E.*: *Enterobacter*; *K.*: *Kluyvera*; *P.*: *Phytobacter*; *R.*: *Rhizobium*; Amp.: ampicilina; Clor.: cloranfenicol; Tri-sulfa.: trimetoprima-sulfametoxazol.

Fonte: Do autor, 2018.

Tabela 04 (cont.) - Resultado da identificação, de acordo com os métodos utilizados, e do teste de susceptibilidade à antimicrobianos por cepa estudada.

Evento	Cepas	VITEK®2 Compact	Provas Bioquímicas Convencionais	MALDI-TOF MS	Sequenciamento <i>rrs</i>	MLSA	Perfil de resistência
	3905	<i>Pantoea spp.</i>	“Complexo <i>E. agglomerans</i> ”	Família Enterobacteriaceae	<i>P. diazotrophicus</i>	<i>P. diazotrophicus</i>	Clor; Tri-sulfa
Surto 4	3909	<i>R. radiobacter</i>	<i>R. radiobacter</i>	<i>R. radiobacter</i>	<i>A. pusense</i>	NE	Clor; Tri-sulfa
	3910	<i>R. radiobacter</i>	<i>R. radiobacter</i>	<i>R. radiobacter</i>	<i>A. pusense</i>	NE	Clor; Tri-sulfa

Legenda: NE: Não Executado; MLSA: *Multilocus Sequence Analysis*; *E.*: *Enterobacter*; *K.*: *Kluyvera*; *P.*: *Phytobacter*; *R.*: *Rhizobium*; Amp.: ampicilina; Clor.: cloranfenicol; Tri-sulfa.: Trimetoprima-sulfametoxazol.

Fonte: Do autor, 2018.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como um dos objetivos fornecer um panorama geral sobre as amostras de NP que foram encaminhadas ao INCQS no período de 2000 a 2016. Informações relacionadas ao encaminhamento das amostras ao INCQS foram avaliadas como: modalidade de análise, cancelamento de amostras, motivo de apreensão, dados relativos aos ensaios de esterilidade realizados no INCQS, laudo analítico, forma de coleta, tempo entre a coleta e a entrada da amostra para análise, volume da amostra, órgão fiscalizador responsável pela apreensão da amostra, região de origem, e número de amostras recebidas por ano para análise no INCQS.

Em relação à modalidade da análise, as análises fiscais representaram a maioria das amostras (61%). Essas análises são realizadas quando existe denúncia de problemas de agravo à saúde relacionados a produtos e insumos para a saúde ou através de programas de análise pré-estabelecidos com órgãos de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1977; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017). As amostras de NP, encaminhadas ao INCQS como modalidade fiscal, eram suspeitas de causarem danos à saúde dos pacientes.

Os lotes das amostras de NP que foram apreendidas para análise de orientação não foram relacionados a danos à saúde dos pacientes que utilizaram o produto. As amostras de orientação, mesmo não sendo previstas na lei, foram uma importante ferramenta de suporte para embasar as ações da VISA. Neste estudo, foi demonstrada a importância de coleta dessas amostras, uma vez que foi verificada contaminação bacteriana em 20,5% das amostras de orientação que não estavam diretamente relacionadas ao evento adverso ocorrido. Este dado também mostra a importância de análises rotineiras desse tipo de produto.

Dentre as amostras que foram canceladas por estarem violadas (abertas), três eram amostras relacionadas ao surto de infecção em neonato no Paraná em 2005, onde foi comprovada a contaminação. Logo, é fundamental que o órgão de Vigilância Sanitária faça a apreensão de amostras que foram administradas no paciente, que sofreu o evento adverso, e também de amostras aleatórias que foram produzidas pela mesma empresa no período do surto, a fim de que sejam realizadas o maior número possível de análises, considerando que nem todas as amostras coletadas podem estar adequadas para serem submetidas ao ensaio de acordo com a legislação. A Lei nº 6437/1977 estabelece que as amostras devem ser invioláveis, para que se assegurem as características de conservação e autenticidade (BRASIL, 1977). Qualquer alteração na amostra resulta em impedimento da análise.

Grande parte dos motivos de apreensão (89%) foi derivada de possíveis contaminações bacterianas de NP. Isso ocorre devido ao risco inerente à NP, que possui a adição de diversos componentes e manipulação por técnica asséptica, aumentando a probabilidade de contaminar o produto final (TURPIN *et al.*, 2012). O motivo de apreensão que consta no TAA é importante para que o laboratório analítico possa direcionar as amostras para determinadas análises, levando-se em consideração o que é necessário investigar.

O direcionamento da análise de controle de qualidade é fundamental no caso de NPs, pois são apreendidas como amostras únicas, não tendo uma quantidade grande suficiente para a realização de diversas análises. Foi observado também que, apesar dos motivos de apreensão estarem relacionados à contaminação, não houve uma uniformidade na sua descrição no TAA.

O volume de NP na amostra de contraprova é um fator que pode impactar no resultado do ensaio de esterilidade (FREAN *et al.*, 1994). Um volume estatisticamente baixo pode acarretar em um resultado falso negativo, pois na parte coletada pode não conter células viáveis do micro-organismo contaminante. Uma amostragem estatisticamente significativa aumenta a precisão do ensaio de esterilidade. As amostras insatisfatórias tinham volume entre 5 mL e 10 mL, mas é importante considerar que diversas amostras fiscais de NPs, nas quais o paciente fez o uso e desenvolveu infecção, apresentaram resultado satisfatório e tinham um volume de 5 mL.

O fabricante retira de cada bolsa de NP um volume padronizado, não levando em consideração se essa quantidade é estatisticamente significativa em relação ao volume total manipulado. No caso das amostras que tiveram laudo analítico satisfatório e que a empresa declarou que encontrou a bactéria contaminante (surto 2, item 4.1.12.2), provavelmente, a contaminação nessas amostras enviadas ao INCQS estava abaixo do limite de detecção do ensaio de esterilidade. Essa diferença de resultado pode ser justificada pelo uso de métodos alternativos de detecção da contaminação.

Apesar do ensaio de esterilidade ser altamente recomendado em todo o mundo e ser descrito em diversas farmacopeias, ele só possui bom desempenho quando existem altos níveis de contaminação (SUTTON, 2010). Por isso, diversas amostras fiscais de NP, que estavam relacionadas a pacientes com infecção, foram avaliadas como satisfatórias pelo ensaio de esterilidade. Diante desse fato, é de suma importância que os laboratórios analíticos possuam técnicas de análises mais sensíveis para detecção de baixa concentração de micro-organismos em produtos estéreis, principalmente em casos de surto de grandes proporções. Esse conjunto de ações ajudaria a promover a segurança do paciente (COSTA *et al.*, 2018).

Além disso, outros motivos podem ter impactado no resultado do ensaio de esterilidade dessas amostras citadas: volume pequeno, visto que as mesmas foram encaminhadas em seringas contendo 3 mL de NP produzida, ou devido ao tempo de 8 dias para o encaminhamento das amostras para análise. O volume amostrado através de seringas, observado nas amostras encaminhadas ao INCQS, variou de 3 a 10 mL.

O volume amostrado de cada bolsa de NP, tanto para amostra de contraprova quanto para controle de qualidade, deveria ser reformulado na legislação. A retenção de amostra de contraprova e amostra para controle de qualidade (esta última não é obrigatória para todas as NP produzidas) é fundamental para tomar medidas de precaução ou elucidação de um surto, mesmo que não estejam relacionadas diretamente a casos de infecção. Atualmente, pela Portaria nº 272/1998, a amostragem é feita por sessão de manipulação, não retirando amostras de todas as bolsas produzidas e nem com o volume variável de acordo com a quantidade final de produto (BRASIL, 1998). Cada bolsa de NP produzida possui uma formulação diferente, logo, são consideradas de lotes diferentes, ainda que tenham sido envasadas numa mesma sessão de manipulação. Por isso, é necessária a retirada de amostra de controle de qualidade de todas as bolsas produzidas.

Outro fator considerado para avaliação da amostra de NP é o tempo entre a coleta das amostras e a entrada no laboratório oficial. Isto vai refletir tanto para que o órgão de Vigilância Sanitária obtenha uma resposta mais rápida quanto para evitar que a amostra perca alguma característica que possa comprometer o resultado final do ensaio. A maior parte das amostras de NP insatisfatórias (93,3%) tiveram um tempo entre a coleta e a entrada da mesma no INCQS de dois dias.

Esse espaço de tempo pode impactar no resultado do ensaio de esterilidade, visto que quanto maior o tempo entre a coleta da amostra e a análise, menor a chance de se detectar micro-organismos viáveis, que é o fundamento desse ensaio. Além disso, o curto tempo entre a notificação de um surto por contaminação bacteriana e a realização do ensaio permite que os órgãos de Vigilância Sanitária tenham ações com base no laudo analítico.

Como o ensaio de esterilidade tem característica destrutiva da amostra analisada, não é possível provar que o produto utilizado estava estéril. Isso porque esse ensaio comprova apenas que um percentual do lote está conforme. Por isso, estão sendo adotadas medidas para a liberação paramétrica de produtos com esterilização terminal, onde a esterilidade é garantida ao longo do processo de produção através de BPF (SUTTON, 2013). A NP não se enquadra na liberação paramétrica, entretanto pode ter a sua qualidade diretamente afetada.

Uma das possibilidades de contaminação das NPs, encaminhadas ao INCQS em 2013,

foi a solução estéril de gluconato de cálcio, pois era um insumo em comum utilizado pelas farmácias de manipulação envolvidas no surto em diferentes estados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; PILLONETTO *et al.*, 2018). De acordo com o estudo, as amostras de gluconato de cálcio estavam contaminadas com *R. radiobacter*, porém não apresentaram clonalidade com outras cepas de NP e hemocultura, não permitindo correlacionar a fonte de contaminação.

A contaminação do gluconato de cálcio é um tópico crítico a ser considerado devido à liberação paramétrica, um tema recentemente inserido no Brasil através da aprovação da Resolução RDC nº 112, de 12 de setembro, 2016 (BRASIL, 2016). Apesar da NP não poder ser submetida à liberação paramétrica, visto que não passa pelo processo de esterilização terminal, a permissão de liberação de insumos para uso parenteral sem a realização do ensaio de esterilidade pode impactar na qualidade final da NP. Isso porque, se um insumo utilizado na formulação da NP estiver previamente contaminado (contaminação intrínseca), a bolsa manipulada será possivelmente contaminada. Devido a isso, é de extrema importância que os fornecedores de insumos utilizados na composição da NP estejam comprometidos com a qualidade de seus produtos, devendo seguir as BPFs e as normas da Anvisa para que a liberação paramétrica seja feita de forma segura, garantindo a esterilidade final do insumo.

Nesse estudo, o percentual de amostras insatisfatórias no ensaio de esterilidade foi de 13%, valor relativamente elevado, mesmo considerando que possa ser superestimado em uma avaliação global, pois referiram-se a amostras suspeitas de terem causado danos aos pacientes. Apesar desse dado ser um indício importante sobre a qualidade das NPs produzidas no Brasil, o real valor de NPs contaminadas pode não ser esse. Para isso, seria necessário um estudo mais abrangente, como em um programa de análise já elaborado pela Anvisa para outros medicamentos, coletando amostras de farmácias produtoras de NP de todas as regiões do país durante um determinado espaço de tempo.

Os dados referentes à região de origem das amostras de NP determinados neste estudo, levantaram a possibilidade de que casos de contaminação de NP estejam passando despercebidos pelos profissionais da área de saúde no Brasil. Em um estudo sobre surtos causados por contaminação de medicamentos e fluidos estéreis, através da análise de artigos publicados em todo o mundo, foi verificado que grande parte dos surtos notificados era proveniente dos Estados Unidos e Europa, que são regiões desenvolvidas economicamente (VONBERG; GASTMEIER, 2007).

De acordo com o Perfil Analítico dos LACENs, publicado em 2016 pela Anvisa, cinco dos 27 LACENs têm capacidade analítica para realizar o ensaio de esterilidade, sendo eles

pertencentes aos seguintes estados: Ceará, Minas Gerais, Pará, Rio de Janeiro (INCQS) e São Paulo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). Apesar do INCQS não ser o único laboratório oficial que realiza o ensaio de esterilidade no Brasil, pode-se considerar preocupante o não recebimento de amostras de NP das demais regiões ao longo de 16 anos. A ausência de amostras de NP das regiões Centro-oeste, Nordeste e Norte pode ter ocorrido por dois motivos: as amostras podem ter sido encaminhadas aos LACENs mais próximos (Ceará, no caso do Nordeste; Pará, no caso a região Norte) ou não houve notificação de casos suspeitos aos órgãos de Vigilância Sanitária.

Os dados encontrados neste estudo também mostram a necessidade da realização de um programa nacional para avaliação de NPs e fiscalização da produção das mesmas. Além disso, é importante que os profissionais da saúde envolvidos na TNP, conforme da Portaria nº 272/98, estejam atentos e sensibilizados para os riscos dessa terapia. Vonberg e Gastmeier (2007) afirmaram que “a educação regular de todos os profissionais de saúde é obrigatória em um programa eficiente para a prevenção de infecções hospitalares”, e consideram a NP como o produto intravenoso mais crítico e com a maior taxa de mortalidade em infecções, em torno de 50%. Essas ações visam promover a segurança do paciente (BRASIL, 2013a).

Outro ponto importante a ser destacado é o empenho em que órgãos de Vigilância Sanitária municipais do Paraná realizam suas ações, pois grande parte das amostras encaminhadas foram apreendidas por profissionais pertencentes a estes órgãos.

No levantamento realizado, observou-se a ocorrência de quatro surtos e que as amostras de NP não possuem uma distribuição uniforme dentre os anos, sendo apreendidas em casos pontuais. Isso se deve ao fato desse produto ser encaminhado aos laboratórios oficiais sob uma demanda espontânea, ou seja, é necessário que um evento adverso suspeito seja notificado à Vigilância Sanitária.

No surto ocorrido no estado do Paraná, de acordo com informações dos processos de amostras desse estudo, a taxa de mortalidade devido à infecção relacionada à NP contaminada foi de 20%, seis pacientes foram a óbito de um total de 30 pacientes acometidos com bacteremia. No surto nacional relatado por Pillonetto et al (2018) ocorreram 56 casos de bacteremia em quatro estados, envolvendo 15 hospitais, com uma taxa de mortalidade de 26,8%. No artigo de Vonberg e Gastmeier (2007) a taxa de mortalidade relatada foi de 48,7% (19 óbitos/39 pacientes com infecção na corrente sanguínea), sendo considerados nove surtos.

Nos processos consultados, não foi observada qualquer menção sobre amostras de NP que foram apreendidas no Rio Grande do Sul, São Paulo ou Minas Gerais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; PILLONETTO *et al.*, 2018). Essas

informações são fundamentais para elucidação do surto, de modo que os laboratórios analíticos pudessem trabalhar em conjunto, possibilitando uma resposta ainda mais rápida para o sistema de VISA. Possivelmente, as amostras não foram encaminhadas ao INCQS porque esses estados (com exceção do Rio Grande do Sul) possuem laboratório com estrutura para realização do ensaio de esterilidade conforme estabelecido pela Farmacopeia Brasileira.

No estudo realizado sobre o surto nacional no Brasil, com início em 2013, os autores que sugeriram a contaminação como fonte única, pois vários estados geograficamente distantes estavam envolvidos. Além disso, verificaram que o surto começou antes da notificação através do uso da técnica de PFGE, pois uma cepa de *R. radiobacter*, pertencente ao grupo clonal do surto, foi identificado em um paciente mais de um mês antes da Vigilância Sanitária ser acionada (PILLONETTO et al, 2018). Isso demonstra que, quando um profissional de saúde verifica em um paciente uma infecção de corrente sanguínea, a qualidade da NP não é verificada de imediato com a farmácia produtora, ressaltando mais uma vez a necessidade de sensibilização de profissionais da saúde para esse problema (BOSZCZOWSKI et al., 2012).

Com base na análise dos processos, foi verificado que infecções causadas por bactérias contaminantes de NP ocorreram no Brasil mesmo após a publicação da Portaria nº 272/1998, que regulamenta as condições de manipulação desse produto (BRASIL, 1998), mostrando a necessidade de algumas adequações nesta norma. Além disso, a fiscalização rigorosa feita pelos órgãos de Vigilância Sanitária estaduais e municipais, em empresas produtoras de NP é fundamental para a verificação da segurança desses produtos (PILLONETTO et al., 2018).

A fim de promover a segurança dos pacientes, seria adequado efetuar algumas mudanças regulatórias nas farmácias de manipulação, como foi feito em alguns países após inúmeros óbitos causados por problemas de contaminação em NP (TRISSEL et al., 2005). Além de garantir a saúde dos pacientes que fazem uso de NP, a redução do risco de infecção da corrente sanguínea melhora os resultados clínicos e econômicos (TURPIN et al., 2011). Por isso, ações de VISA são necessárias para melhor controle e atenção às NPs produzidas no Brasil;

De acordo com uma notícia publicada na revista eletrônica da Câmara dos Deputados no dia 03 de julho de 2017, foi realizada uma audiência pública da Comissão de Legislação Participativa, com o objetivo de discutir os dois métodos de uso da NP (industrializada, com concentrações padronizadas, ou manipulada, de acordo com as necessidades de cada paciente) e seus riscos. Estavam presentes os parlamentares e representantes de órgãos reguladores e da indústria farmacêutica (CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2017). Porém, até o presente

momento, não foram encontrados dados de alguma modificação na Portaria nº 272/1998.

Outro objetivo deste estudo foi avaliar os contaminantes de NP isolados no INCQS, buscando elucidar a identificação das espécies envolvidas. Para tal, vários métodos foram empregados. Verificou-se que a identificação das cepas analisadas por provas bioquímicas convencionais e automatizadas (VITEK®2 *Compact*) proporcionou resultados equivocados para determinação do gênero e da espécie bacteriana. O equipamento VITEK®2 *Compact* possui um ótimo desempenho quando utilizado para identificar espécies clínicas que são difundidas no meio hospitalar, conhecidas como causadoras de infecção.

Quando se trata de cepas ambientais, o resultado do VITEK®2 *Compact* fica comprometido, pois depende diretamente dos perfis metabólicos de espécies previamente inseridas em sua base de dados, que no caso da família Enterobacteriaceae, possui 67 espécies contra mais de 250 espécies descritas (PINCUS, 2013; PARTE, 2018). Além disso, a identificação baseada em testes bioquímicos está diretamente relacionada às condições ambientais e as provas bioquímicas utilizadas nem sempre são suficientes para a discriminação de todas as espécies descritas, além de outras variáveis (MORAES *et al.*, 2013).

A identificação feita pela espectrofotometria de massa, MALDI-TOF MS, também não foi eficaz para a identificação das enterobactérias ambientais, visto que apenas duas cepas foram identificadas em espécie. Porém, observou-se que este equipamento não proporciona resultados equivocados, ou ele não identifica ou mostra a família a qual a cepa pertence. Assim como a identificação pelo sistema VITEK®2 *Compact*, a identificação por este método depende primariamente dos espectros de massa referentes aos micro-organismos inseridos em seu banco de dados. Além disso, por se tratar de gêneros recentemente descritos, os mesmos ainda não fazem parte da base de dados do equipamento utilizado, não sendo possível a identificação (ANGELAKIS *et al.*, 2014). O sistema MALDI-TOF MS apresenta como vantagem a possibilidade de ampliação de seu banco de dados com espectros referentes a proteínas ribossomais.

Com base no dendrograma elaborado usando o MALDI-TOF MS, não foi possível afirmar que todas as cepas pertencentes ao grupo I correspondiam a uma mesma espécie com biodiversidade fenotípica (ANGELAKIS *et al.*, 2014) ou se poderia haver alguma espécie diferente dentro do grupo, visto à restrição da técnica para diferenciação de taxa intimamente relacionados (WANG *et al.*, 2012). Além disso, o agrupamento de espécies em um dendrograma a partir de MALDI-TOF MS não é referente a dados filogenéticos e evolutivos, sendo calculado com base na orientação relativa dos grupos (DIECKMANN *et al.*, 2005). Os

dados evolutivos são obtidos pela análise de marcadores genéticos, como por exemplo, o sequenciamento do gene *rrs* e outros genes *housekeeping*.

Pelos métodos fenotípicos, incluindo os proteômicos, não foi possível chegar a uma identificação final das cepas estudadas. Foi necessária a aplicação de métodos genotípicos para elucidar a identificação.

Os micro-organismos isolados de NP no INCQS, que foram identificados nesse estudo utilizando a análise da sequência do gene *rrs* e MLSA, são: *A. pusense*, *Kosakonia* spp. e *P. diazotrophicus*.

A. pusense é um bastão Gram negativo, com crescimento entre 16 a 41°C e pH 7,5, catalase e oxidase positivas, podendo crescer em anaerobiose na presença ou ausência de nitrato de potássio (PANDAY; SCHUMANN; DAS, 2011). Apesar do sequenciamento do gene *rrs* ter possibilitado a identificação correta das cepas 3909 e 3910, algumas características fenotípicas, descritas por Panday, Schumann e Das (2011) sobre *A. pusense*, não estão de acordo com as características obtidas na análise no VITEK®2 Compact. Segundo o estudo de descrição dessa espécie, os autores afirmam que a bactéria utiliza adonitol, celobiose, maltose, D-manitol, D-manose, D-sorbitol, sacarose, L-prolina e L-ornitina como fontes de carbono. Porém, ambas as cepas não utilizam esses compostos como fontes de carbono, com exceção da cepa 3910 que utiliza o adonitol.

Diante de diferenças no fenótipo das cepas e a cepa tipo da espécie *A. pusense*, seria prudente o sequenciamento de outros genes *housekeeping* para se obter dados mais concretos sobre a identificação dessa espécie, a fim de confirmar o resultado obtido pela análise da sequência do gene *rrs*.

O gênero *Agrobacterium* é composto por quatro espécies válidas: *Agrobacterium nepotum*, *A. pusense*, *A. salinitolerans*, *Agrobacterium skierniewicense* (PARTE, 2018), sendo considerado um grupo com bactérias que são eventualmente patogênicas e filogeneticamente muito próximas ao gênero *Rhizobium* (MOUSAVI *et al.*, 2015).

A cepa de referência *R. radiobacter* ATCC 4720 era classificada como *Agrobacterium tumefaciens*, porém todas as cepas dessa espécie foram reclassificadas para *R. radiobacter* por Young *et al* em 2001 (PARTE, 2018). Isso explica o fato de não estar agrupada com a cepa tipo de *R. radiobacter* na árvore filogenética com base no gene *rrs*. No estudo realizado por Mousavi *et al* em 2015, eles verificaram que as espécies que eram classificadas como *A. tumefaciens*, em uma árvore concatenada com seis genes *housekeeping*, estavam se agrupando com a cepa tipo de *R. radiobacter*, sustentando a hipótese de Young *et al* (2001) de excluir *A. tumefaciens* como uma espécie válida. Logo, o epíteto *radiobacter* tem prioridade em relação

ao *tumefaciens*. Nesse estudo os autores verificaram também a manutenção do gênero *Agrobacterium*, que foi questionada por alguns autores.

A família Rhizobiaceae vem passando por diversas reclassificações para melhor delineamento das espécies nos diferentes gêneros. Esses estudos são baseados no sequenciamento do genoma total e também no MLSA (MOUSAVI *et al.*, 2015; ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2015).

No trabalho publicado referente ao surto de sepse ocorrido em 2013, Pillonetto *et al.* (2018) identificaram a bactéria da família Rhizobiaceae como *R. radiobacter* e não como *A. pusense*. Apesar do biotipo do VITEK®2 Compact não ter sido o mesmo para as cepas da família Rhizobiaceae de Pillonetto *et al.* (2018) e do presente trabalho, por se tratar de um surto único, é possível que as cepas *R. radiobacter* e *A. pusense* correspondam à mesma bactéria. Quando as sequências do gene *rrs* dessas cepas foram alinhadas no BLASTn, apresentaram 100% similaridade reforçando ainda mais a hipótese de que sejam a mesma espécie.

Isso pode ter ocorrido devido ao tamanho da sequência do gene *rrs* obtida pelos autores, que foi de 402 pb, um tamanho inferior em relação às sequências obtidas no presente trabalho (1.427 pb). Esse tamanho de sequência (402 pb) é considerado pequeno para diferenciar espécies, principalmente no caso de bactérias da família Rhizobiaceae, que possuem alta similaridade desse gene.

As outras cepas relacionadas ao mesmo surto que o *A. pusense* é o *P. diazotrophicus*. Essa bactéria foi isolada pela primeira vez em raiz de arroz por Zhang *et al.* (2008), porém o *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* não a reconheceu como uma espécie válida e nem aceitou a designação de um gênero novo devido à ausência de alguns experimentos. Em 2017, o periódico reconheceu os novos gênero e espécie por meio da publicação do trabalho de Pillonetto *et al.* (2017). Nesse estudo, eles realizaram o sequenciamento do gene *rrs*, utilizaram MLSA, hibridação DNA-DNA digital e assinaturas genômicas para a definição do gênero e de novas espécies, além de identificarem corretamente bactérias que foram previamente depositadas em diversas coleções com espécies equivocadas.

Apesar de *P. diazotrophicus* ser uma espécie fixadora de nitrogênio e relacionada a plantas, Pillonetto *et al.* (2017) demonstraram que esse gênero possui relevância clínica, tendo sido relacionado a diversos surtos (GAVINI *et al.*, 1989; BOSZCZOWSKI *et al.*, 2012; SHEPPARD *et al.*, 2016; PILLONETTO *et al.*, 2018). Por se tratar de um gênero novo, ainda não existem estudos relatando o potencial de virulência dessas cepas.

Assim como o *Phytobacter*, o gênero *Kosakonia* é composto por bactérias fixadoras de nitrogênio, podendo ser isoladas de solo e árvores (BRADY *et al.*, 2013). O gênero *Kosakonia* foi definido por um estudo taxonômico polifásico, no qual foi feita a reclassificação de espécies *Enterobacter* para três diferentes gêneros: *Kosakonia*, *Lelliottia* e *Pluralibacter*, além de demonstrar a diferenciação desses gêneros com *Enterobacter* e *Cronobacter* (BRADY *et al.*, 2013).

Recentemente, cepas do gênero *Kosakonia* foram relatadas como bactérias de importância médica. De acordo com Bhatti *et al.* (2017), uma cepa clínica de *K. radicincitans*, que causou sepse em um paciente imunocomprometido, possuía quatro genes codificadores de potenciais fatores de virulência, dos quais três estão presentes na cepa tipo de *E. cloacae* subsp. *cloacae*, que é uma bactéria reconhecida como um patógeno humano. As cepas 3379 e 3381 compartilham uma similaridade de 99,59% na sequência do gene *rrs* com essa espécie (*K. radicincitans*). Entretanto, por se tratar de uma possível nova espécie, seria interessante um estudo do genoma total a fim de verificar a presença de tais genes codificadores de potenciais fatores de virulência. Esses fatores descritos no estudo de Bhatti *et al.* (2017) são: *operon* de fímbria, sistemas de secreção tipos IV e VI, e síntese de enterobactina. Em outro estudo feito com base no genoma de *Kosakonia cowanii*, foram encontrados nove genes codificadores de fator de secreção tipo III e cinco genes que estão relacionados à biogênese do tipo IV (YANG *et al.*, 2018).

Em contradição com o que foi descrito por Pillonetto *et al.* (2017), algumas cepas isoladas identificadas como *P. diazotrophicus* foram positivas para a produção de L-prolina arilamidase. Os resultados estão em concordância em relação a fosfatase e glicina, que foram negativos para *P. diazotrophicus* e positivas para *Kosakonia* spp. A cepa 5020RM da espécie *P. diazotrophicus*, que é referente ao estudo de Pillonetto *et al.* (2018), apresentou 100% de alinhamento em todas as árvores construídas com as cepas do presente estudo, sugerindo tratar de bactérias envolvidas em um mesmo surto de contaminação de NP.

A análise de MLSA mostrou boa resolução para a separação de diversos gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae apresentando na árvore filogenética melhor suporte de *bootstrap* em relação à árvore filogenética do gene *rrs*, pois praticamente todos os rearranjos apresentaram uma porcentagem acima dos 50%. Nesta análise as cepas de *Kosakonia* (3379 e 3381) são candidatas a uma nova espécie do gênero, visto que formam um grupo distinto das sete espécies já descritas.

Os gêneros *Phytobacter* e *Kosakonia* são derivados do complexo *E. agglomerans*, fazendo parte do biotipo XII (PILLONETTO *et al.*, 2017) e do biotipo IX (INOUE *et al.*,

2000; GRIMONT; GRIMONT, 2005; BRADY *et al.*, 2013), respectivamente. O complexo *E. agglomerans* é formado por bactérias que causam infecções oportunistas (GRIMONT; GRIMONT, 2005), e sua divisão deu origem a diversos outros gêneros baseados na diferenciação dos 13 biotipos definidos por Brenner *et al* (1984).

O gênero *Enterobacter* foi proposto por Hormaeche e Edwards em 1960 e sua cepa tipo, *E. cloacae*, foi isolada pela primeira vez em 1890 por Jordan, sendo reconhecida como pertencente a esse gênero em 1980 (PARTE, 2018). Diversas espécies desse gênero vêm passando por diversas reclassificações ao longo dos anos, pois a filogenia com base em sequências do gene *rrs* não fornece resolução suficiente quando espécies estreitamente relacionadas são estudadas (GRIMONT; GRIMONT, 2005). Um exemplo disso é o gênero *Pantoea*, que foi descrito em 1989 por Gavini *et al*, sendo derivado da reclassificação da espécie *E. agglomerans* (Beijerinck 1888) para *P. agglomerans*. Esse gênero é também considerado um subgrupo do complexo *E. agglomerans*. A espécie *K. intermedia* é derivada de uma reclassificação da espécie *E. intermedia*, que ocorreu em 2005, com base no estudo de Pavan *et al* (PARTE, 2018).

A taxonomia polifásica usa atualmente combinações de diferentes conjuntos de dados fenotípicos e/ou genotípicos para definir gêneros, espécies e entidades ao nível de subespécies ou abaixo dele (SPINALI *et al.*, 2015). Por isso, todos esses estudos demonstram a importância da abordagem polifásica e do estudo de genes para a definição de gêneros e espécies.

Com base no sequenciamento de cinco genes e no alinhamento idêntico das 14 cepas submetidas ao MLSA, é possível que todas as cepas sejam correspondentes a um mesmo clone. A análise pelo MALDI-TOF MS apresentou a formação de diversos *clusters* dentro do grupo I, formado pelas cepas de *P. diazotrophicus*. Isso pode ter ocorrido por diversos fatores: a expressão de proteínas em cada cepa não era idêntica, diferenciando o seu perfil de espectro; ou pode ter sido influência da técnica de transferência da biomassa para o *spot* da lâmina que foi inserida no equipamento. Para afirmar que as 22 cepas pertençam a um mesmo clone, seriam necessárias técnicas adicionais de tipificação, como por exemplo, PFGE.

São vistos na literatura relatos de diversos surtos causados por *Pantoea* spp., bactérias as quais são identificadas por sistemas automatizados (HABSAH *et al.*, 2005; TIWARI; BERIHA, 2015). Tais cepas podem pertencer ao gênero *Phytobacter* que foi recentemente descrito. Ao contrário da espécie *R. radiobacter*, o *A. pusense* não é descrito na literatura como um patógeno humano usual. No levantamento bibliográfico foi encontrado apenas um artigo citando esta espécie causando infecção no homem, sendo isolado de diversos sítios

anatômicos (AUJOULAT *et al.*, 2015).

Assim como ocorreu com *Phytobacter* e *Kosakonia*, a identificação inicial de *A. pusense* foi limitada, pois sistemas automatizados de identificação tem seu resultado final fundamentado em bancos de dados. Como essas espécies bacterianas foram recentemente descritas e ainda estão sendo relatadas como espécies de importância clínica, o VITEK®2 *Compact* e o VITEK®MS RUO não possuem essas cepas depositadas em sua base de dados, impossibilitando a identificação ou identificando de forma equivocada.

O método de MLSA se mostrou eficiente para a identificação de enterobactérias, tanto na diferenciação dos gêneros quanto na diferenciação de espécies, podendo ser uma alternativa mais acessível do que a hibridação DNA-DNA e sequenciamento do genoma total para a identificação dessas bactérias. Os resultados da identificação por MLSA têm ainda maior exatidão quando utilizado um maior número de genes (ADEOLU *et al.*, 2016).

Devido a problemas encontrados para amplificação dos genes pela técnica de MLSA, quando ocorre a amplificação de fragmentos inespecíficos, uma sugestão seria estudar iniciadores que sejam mais específicos para os gêneros *Kosakonia* e *Phytobacter*, a fim de minimizar a amplificação de fragmentos inespecíficos. É importante ressaltar que essa questão não interferiu no resultado final do sequenciamento, pois as condições da PCR foram ajustadas. Além disso, os genes foram sequenciados obtendo-se ambas as fitas do fragmento do DNA, o que possibilita checagem dupla das sequências nucleotídicas amplificadas. Problemas em relação a desenho de iniciadores foram relatados por Glaeser e Kämpfer (2015), incluindo situações em que o fragmento não é amplificado ou quando há a presença de fragmentos inespecíficos.

A utilização de métodos adequados de identificação é de extrema importância tanto na área médica quanto no controle de qualidade de produtos. Segundo Boszczowski *et al.* (2012), dificuldades na identificação do patógeno pode retardar a verificação do surto e a elaboração de medidas de controle. Além disso, quando a infecção é causada por um micro-organismo de um gênero incomum no ambiente hospitalar, a identificação pode tornar ainda mais demorada quando não são aplicadas técnicas mais confiáveis.

No surto 2, relatado neste trabalho, a empresa que foi contratada pela farmácia de manipulação identificou a bactéria *E. agglomerans* como contaminante da NP, não mencionando qual o método de identificação usado. Como relatado anteriormente, bactérias pertencentes a esse complexo passaram por diversas reclassificações, logo, é provável que essa bactéria não seja *P. agglomerans*, podendo pertencer ao gênero *Phytobacter*. Um surto ocorrido em 2010 relatado por Boszczowski *et al.* (2012) foi causado pela bactéria *P.*

agglomerans, que era contaminante de uma solução intravenosa de anticoagulante. Porém, Pillonetto et al (2017) verificaram, por meio da sequência do gene *rrs* depositada no GenBank, que essa cepa se tratava na verdade da espécie *P. diazotrophicus*. Logo, essa espécie bacteriana está associada à contaminação de fluidos parenterais no Brasil antes mesmo do surto ocorrido em 2013.

Diante das referências bibliográficas encontradas, é importante ressaltar que o gênero *Enterobacter* está relacionado a casos de contaminação de NP em diversos países, incluindo o Brasil (JARVIS et al., 1983; VERSCHRAEGEN et al., 1988; FOSTER, 1994; TRESOLDI et al., 2000; GONÇALVES et al., 2000; CAMPOS et al., 2007; KÔSE et al., 2016). As espécies relatadas mais frequentemente são *E. cloacae* e *E. agglomerans*, que são fenotipicamente parecidas com *P. diazotrophicus* e espécies de *Kosakonia*.

O presente estudo, além de identificar as cepas provenientes de NP contaminadas, teve como objetivo determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dessas cepas. Esse teste é importante porque essas bactérias foram suspeitas de causar sepse e bacteremia, sendo necessário o uso de terapia com antimicrobianos para combater essa infecção.

As cepas identificadas como *P. diazotrophicus* e *A. pusense* apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, sendo resistentes ao cloranfenicol e trimetopim-sulfametoxazol. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos sugere que a fonte de contaminação possa ser a mesma para as duas espécies, pois em geral não é comum bactérias de diferentes famílias apresentarem um mesmo perfil de resistência. Além disso, esse perfil pode sugerir também que a fonte de contaminação é de origem ambiental, pois as cepas são sensíveis a maioria dos antimicrobianos, considerando que cloranfenicol e trimetopim-sulfametoxazol podem ser encontrados distribuídos no ambiente. O cloranfenicol era utilizado como medida profilática na aquicultura (CHIENA; LAIA; LIU, 1999), mas foi proibido pelo Ministério da Agricultura (LE MOS; RODRIGUES; LOPES, 2006). A utilização indiscriminada e descarte inadequado dos antimicrobianos resulta na contaminação dos corpos d'água, que são usados no abastecimento de água para a população e indústrias (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

Algo importante a ser ressaltado é que, apesar de se tratarem de espécies diferentes, *P. diazotrophicus* e *A. pusense*, são provenientes de um mesmo surto de sepse devido ao uso de NP contaminada e apresentaram o mesmo perfil de resistência aos antimicrobianos testados. Isso levanta a possibilidade de serem derivados de uma mesma fonte contaminante da NP apreendida.

Foi relatado por Pillonetto et al (2017), uma cepa de *P. diazotrophicus*, isolada de

swab de vigilância epidemiológica, resistente a múltiplos antimicrobianos. Esse achado também ocorreu em um hospital de Curitiba, porém no ano de 2015, após a ocorrência do surto de NP contaminada em 2013.

As cepas de *Kosakonia* spp. foram resistentes apenas à ampicilina. Segundo o estudo de Bhatii et al (2017), a cepa de *K. radicincitans* foi sensível à ampicilina, sendo considerada sensível à maioria dos antimicrobianos. As cepas 3379 e 3381 do gênero *Kosakonia* também são consideradas sensíveis. Entretanto, foram resistentes a apenas um dos antimicrobianos testados, a ampicilina. Ainda de acordo com os autores desse estudo, nenhuma das dez cepas de *Kosakonia* com genoma completo disponível no site do GenBank possui o gene *ampC*, que está presente em cepas de *Enterobacter* spp., podendo conferir resistência a uma gama de agentes β -lactâmicos quando não reprimidos (MEZZATESTA; GONA; STEFANI, 2012). Porém, em um estudo recentemente publicado, foram encontrados 23 genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos na cepa tipo de *K. cowanii*, sendo seis genes responsáveis pela expressão de β -lactamase (YANG *et al.*, 2018). Até o presente momento, não foram encontrados estudos abordando o perfil de susceptibilidade e resistência aos antimicrobianos de bactérias pertencentes ao gênero *Kosakonia*.

No estudo de Ash, Mauck e Morgan (2002), 90% das bactérias isoladas de 22 rios ao longo de três anos nos Estados Unidos foram resistentes à ampicilina, predominando bacilos Gram negativos não fermentadores de lactose. Muitas dessas cepas possuíam plasmídeo, que foi o responsável pela transferência de genes de resistência naquele ambiente (TRAN-DIEN *et al.*, 2018).

A ampicilina foi o primeiro antimicrobiano a ser utilizado para o tratamento de infecções causadas por bactérias da família Enterobacteriaceae, sendo amplamente utilizada até hoje (TRAN-DIEN *et al.*, 2018). A sua ação antimicrobiana está relacionada à capacidade de se ligar a enzimas de membranas que participam da biossíntese de parede celular. A ampicilina bloqueia a atividade de tais enzimas, comprometendo etapas fundamentais na formação da parede celular (CHUDOBOVA *et al.*, 2014). Bactérias que são resistentes à ampicilina são capazes de produzir β -lactamase, que é uma enzima responsável por hidrolisar o anel β -lactâmico da molécula desse antimicrobiano, fazendo com que o mesmo perca sua capacidade de se ligar a enzimas de membrana. Em enterobactérias e em bactérias Gram negativas, em geral, a produção de β -lactamase é o principal mecanismo de resistência. Por isso, diante da resistência à ampicilina apresentada pelas cepas 3379 e 3381, seria importante a repetição do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizando o disco impregnado com ampicilina/sulbactam, a fim de verificar a resistência a inibidores de β -lactamase e, em

paralelo, o estudo do genoma para pesquisa do gene *ampC*.

6 CONCLUSÃO

- Ao longo de 17 anos (2000 a 2016), o INCQS recebeu 134 amostras de NP relacionadas a quatro surtos de NP envolvida em casos de infecção, sendo encaminhadas de acordo com uma demanda espontânea;
- O surto ocorrido em 2005 foi causado por uma bactéria pertencente ao gênero *Kosakonia*, candidata a uma nova espécie;
- O surto iniciado em 2013 foi causado por duas bactérias distintas e que não são comuns causando infecção, *P. diazotrophicus* e *A. pusense*;
- Dos métodos utilizados para identificação dos contaminantes bacterianos de NP, este estudo mostrou que: o VITEK®2 *Compact* e as provas bioquímicas convencionais apresentaram um resultado equivocado; o VITEK®MS RUO direcionou a identificação para a família Enterobacteriaceae; enquanto o sequenciamento do gene *rrs* indicou o gênero e as espécies mais prováveis; e o MLSA proporcionou a espécie, embora não tenha sido realizado por todos;
- Apesar das duas cepas estudadas apresentarem quase 100% de similaridade com o *A. pusense* na análise filogenética do gene *rrs*, a família Rhizobiaceae e o gênero *Agrobacterium* ainda possuem diversas incertezas taxonômicas, sendo necessária a realização da técnica de MLSA para a confirmação da identificação dessas bactérias;
- As cepas identificadas como *P. diazotrophicus* e de *A. pusense* foram resistentes aos antimicrobianos cloranfenicol e trimetopim-sulfametoxazol. As cepas identificadas como *Kosakonia* spp. apresentaram resistência à ampicilina;
- A melhoria de protocolos de identificação de bactérias de origem ambiental é necessária, e deve ser implementada em laboratórios de referência, visto que as mesmas podem acometer pacientes através de fluidos intravenosos, incluindo NP.

REFERÊNCIAS

ADÉKAMBI, T. et al. Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA–DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, n. 8, p. 1807-1814, 2008. Disponível em: <https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.65440-0#tab2>. Acesso em: 31 jan. 2019.

ADEOLU, M. et al. Genome based phylogeny and taxonomy of the "*Enterobacteriales*": proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 66, n. 12, p. 5575-5599, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/308050768_Genome_based_phylogeny_and_taxonomy_of_the_Enterobacteriales_proposal_for_Enterobacterales_ord_nov_divided_into_the_families_Enterobacteriaceae_Erwiniaceae_fam_nov_Pectobacteriaceae_fam_nov_Yersiniaceae. Acesso em: 3 ago. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Gerência de vigilância e monitoramento em serviços de saúde comunicado de risco nº 001/2014**: orientações para os serviços de saúde em virtude da suspensão do uso em todo o território nacional de lotes de gluconato de cálcio 10% de um fabricante: resultados insatisfatórios no teste de esterilidade e aspecto. 2014. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/alertas/item/comunicado-de-risco-001-2014>. Acesso em: 16 maio 2017.

AGÊNCIA Nacional De Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 01 nov. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Perfil analítico da rede nacional de laboratórios de vigilância sanitária**. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33860/266831/Rede+Nacional+de+Laborat%C3%B3rios+da+Vigil%C3%A2ncia+Sanit%C3%A1ria+por+perfil+anal%C3%ADtico/2819dd39-4f87-48d7-97fa-8225e1ba08b>. Acesso em: 10 jan. 2018.

ALLWOOD, M. C. Microbiological risks in parenteral nutrition compounding. **Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 60-61, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058456>. Acesso em: 17 maio 2017.

ALNAJAR, S.; GUPTA, R. S. Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the Family. **Infect Genet Evol**, v. 26, n. 54, p. 108-127, 2017.

Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317970110_Phylogenomics_and_comparative_genomic_studies_delineate_six_main_clades_within_the_family_Enterobacteriaceae_and_support_the_reclassification_of_several_polyphyletic_members_of_the_family. Acesso em: 3 ago. 2017.

ALVES, L. M. C. *et al.* The Family *Rhizobiaceae*. In: Rosenberg, E. *et al.* (ed.). **The Prokaryotes**: alphaproteobacteria and betaproteobacteria. 4. ed. Springer Berlin Heidelberg, 2014, p. 419. Disponível em: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-30197-1_297#page-1. Acesso em: 10 ago. 2017.

AMERICAN SOCIETY OF PHARMACEUTICAL HEALTH SYSTEMS. ASHP guidelines on the safe use of automated compounding devices for the preparation of parenteral nutrition admixtures. Developed through the ASHP council on Professional Affairs and approved by the ASHP board of directors on April, 27, 2000. **Am J Health Syst Pharm.**, v. 57, p.1343-1348, 2000. Disponível em: <http://www.ajhp.org/content/ajhp/57/14/1343.full.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2017.

ANGELAKIS, E. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry and identification of new bacteria species in air samples from Makkah, Saudi Arabia. **BMC Res Notes**, v. 7, n. 892, 2014. Disponível em: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-892>. Acesso em: 28 set. 2018.

AQUINO, S.F.; BRANDT, E.M.F.; CHERNICHARO, C.A.L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Eng Sanit Ambient**, v. 18, n.3, p. 187-204, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/esa/v18n3/1413-4152-esa-18-03-00187.pdf>. Acesso em: 14 out. 2018.

ARAGAO, P. A. *et al.* *Pichia anomala* outbreak in a nursery: Exogenous source? **Pediatr Infect Dis J**, v. 20, n. 9, p. 843-848, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734761>. Acesso em 24 maio 2017.

ARSLAN, L. *et al.* Surto de sepse em *Serratia marcescens* em unidade de terapia intensiva neonatal. **Pediatr Int**, v. 52, n. 2, p. 208-212, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664012/>. Acesso em: 14 nov. 2018.

ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49-59, 2017. Disponível em: <http://essays.biochemistry.org/content/61/1/49.full>. Acesso em: 31 out. 2017.

ASH, R. J.; MAUCK, B.; MORGAN, M. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in Rivers, United States. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 7, p. 713-716, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730334/#>. Acesso em: 15 out. 2018.

AUAD, G. R. V. Preparo das formulações: Biossegurança. *In: CALIXTO-LIMA et al. Manual de nutrição parenteral*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. p. 149-159

AUJOULAT, F. *et al.* *Rhizobium pusense* is the main human pathogen in the genus *Agrobacterium/Rhizobium*. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 5, 2015. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)00141-4/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)00141-4/fulltext). Acesso em: 15 out. 2018.

AUSTIN, P. D. **Microbial risk during the Ward-pharmacy intravenous prescribing cycle**. 2016. 270 f. Tese (Doutor em Filosofia) – Faculdade de Medicina, Universidade de Southampton, Southampton, 2016. Disponível em: https://eprints.soton.ac.uk/416631/1/Final_Peter_Austin_PhD_8_May_2016.pdf. Acesso em: 28 nov. 2018.

BANTON, J. Techniques to prevent central venous catheter infection: products, research, and recommendations. **Nutr Clin Pract**, Madison, v. 21, n. 1, p. 56-61, fev. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439770>. Acesso em: 17 maio 2017.

BARGHOUTHI, S. A. A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. **Indian J Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 430-444, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209952/>. Acesso em: 06 ago. 2017.

BARSOUM, N.; KLEEMAN, C. Now and Then, the History of Parenteral Fluid Administration. **Am J Nephrol**, v. 22, p. 284–289, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097754>. Acesso em: 01 ago. 2017.

BERGEY'S Manual of systematic Bacteriology. 2. ed. Michigan: Springer, 2005. v. 2, pt. A.

BERGEY'S Manual of systematic Bacteriology. 2. ed. Michigan: Springer, 2005. v. 2, pt. B.

BEYE, M. *et al.* Careful use of *rrs* gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* Species. **New Microbes New Infect**, v. 22, p. 24–29, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5857167/?report=classic>. Acesso em: 13 out. 2018.

BHATTI, M. D. *et al.* Identification and whole genome sequencing of the first case of *Kosakonia radicincitans* causing a human bloodstream infection. **Front Microbiol**, v. 8, n. 62, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5258702/>. Acesso em: 12 out. 2018.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, p. 42–51, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/nrmicro/journal/v13/n1/full/nrmicro3380.html?message-global=remove>. Acesso em: 31 out. 2017.

BOSZCZOWSKI, I. *et al.* Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* bacteraemia associated with contaminated anticoagulant citrate dextrose solution: new name, old bug? **J Hosp Infect**, v. 80, n. 3, p. 255-258, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22245117>. Acesso em: 03 ago. 2017.

BOU, G. *et al.* Nosocomial outbreaks caused by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 6, p. 968-971, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2600284/#>. Acesso em: 14 nov. 2018.

BOU, G. *et al.* Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 29, n. 8, p. 601-608, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684044>. Acesso em: 02 ago. 2017.

BRADY, C. *et al.* Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). **Syst Appl Microbiol**, v. 31, p. 447-460, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008066>. Acesso em: 04 jan. 2018.

BRADY, C. *et al.* Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. **Syst Appl Microbiol**, v. 36, n. 5, p. 309-319, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202013000635?via%3Dihub>. Acesso em: 21 nov. 2018.

BRASIL. Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 set. 1976. p. 12647. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/CCivil_03/leis/L6360.htm. Acesso em: 10 abr. 2017.

BRASIL. Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à Legislação Sanitária Federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 ago. 1977b. p. 11145. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6437. Acesso em: 10 abr. 2017.

BRASIL. Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, suplemento, p. 1, 12 set. 1990a. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1990/lei-8078-11-setembro-1990-365086-norma-pl.html>. Acesso em: 30 out. 2018.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições de promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 18055, 20 set. 1990b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 272, de 8 de abril de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para fixar os requisitos mínimos exigidos para a Terapia de Nutrição Parenteral. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 abr. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC nº 36, de 25 de julho de 2013. Institui ações para a segurança do paciente em serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 jul. 2013a. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0036_25_07_2013.html. Acesso em: 25 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete Ministerial. Portaria nº 529, de 1 de abril de 2013. Institui o Programa Nacional de Segurança do Paciente. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 02 abr. 2013b. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/portaria-529>. Acesso em: 25 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete Ministerial. Portaria nº 2.095, de 24 de setembro de 2013. Aprova os protocolos básicos para a Segurança do Paciente. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 set. 2013c. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt2095_24_09_2013.html. Acesso em: 25 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC nº 112, de 12 de setembro de 2016. Define os requisitos mínimos para concessão e cancelamento da adoção da liberação paramétrica em substituição ao teste de esterilidade junto à ANVISA. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 set. 2016. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2977195/RDC_112_2016_.pdf/11c7165b-ce52-4266-94ae-6781b10e5a9a. Acesso em: 15 jan. 2018.

BRENNER, D. J. *et al.* Attempts to classify herbicola group—*Enterobacter agglomerans* strains by deoxyribonucleic acid hybridization and phenotypic tests. **Int J Syst Bacteriol**, v. 34, p. 45-53, 1984. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/34/1/ijms-34-1-45.pdf?expires=1550862750&id=id&accname=capesmembers&checksum=8D148B0D49E085426BB0ABADFF9A1236>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

BRENNER, D. J.; FARMER III, J. J. Family I. Enterobacteriaceae. *In*: THE PROTEOBACTERIA, part B: the gammaproteobacteria. v. 2.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. ed. Michigan: Springer, 2005. v. 2, pt. B, p. 587-607.

BUGNO, A. **Esterilidade**: validação de metodologia e propostas de otimização de resultados. 2001. 161f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-08032010-172454/pt-br.php>. Acesso em: 08 maio 2015.

CABUT, S. Nourrissons de Chambéry: la bactérie (probablement) responsable identifiée. **Le Monde**, Chambéry, 17 mar. 2015. Disponível em: https://www.lemonde.fr/sciences/article/2015/03/17/nourrissons-de-chambery-la-bacterie-probablement-responsable-identifiee_4595235_1650684.html. Acesso em: 28 nov. 2018.

CÂMARA DOS DEPUTADOS. CLP promove audiência sobre a melhoria do atendimento de pacientes que necessitam de alimentação parenteral. **Boletim Eletrônico**, Brasília, 03 jul. 2017. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/clp/noticias/clp-promove-audiencia-sobre-a-melhoria-do-atendimento-de-pacientes-que-necessitam-de-alimentacao-parenteral>. Acesso em: 15 out. 2018.

CAMPOS, L. C. *et al.* Outbreak of *Enterobacter hormaechei* septicaemia in newborns caused by contaminated parenteral nutrition in Brazil. **J Hosp Infect**, v. 66, n. 1, p. 95-97, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670107000606>. Acesso em: 14 nov. 2018.

CARANNANTE, A. *et al.* Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for Identification and Clustering of *Neisseria Gonorrhoeae*. **BMC Microbiol**, v. 15, n. 142, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514454/>>. Acesso em: 28 set. 2018.

CHIEN, Y. H.; LAI, H. T.; LIU, S. M. Modeling the effects of sodium chloride on degradation

of chloramphenicol in aquaculture pond sediment. **Sci Total Environ**, v. 239, n. 1-3, p. 81-87, 1999.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: informal supplement**. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. (CLSI document M100-S28).

COELHO, S. C.; BENARROZ, M. O.; CALIXTO-LIMA, L. História da nutrição parenteral. *In*: CALIXTO-LIMA et al. **Manual de nutrição parenteral**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. p. 1-9.

CORRÊA, J. C. V. **Qualidade dos medicamentos comercializados no Brasil segundo dados do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e do Instituto Adolfo Lutz**. 2003. 152 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

COSTA, L. V. **Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada dedicado à produção de penicilínicos em Farmanguinhos - Fiocruz**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) – Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

COSTA, D. G. *et al.* Análise do preparo e administração de medicamentos no contexto hospitalar com base no pensamento *Lean*. **Rev Esc Anna Nery**, v. 22, n. 4, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1414-81452018000400204&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 24 set. 2018.

CHUDOBOVA, D. *et al.* effect of ampicillin, streptomycin, penicillin and tetracycline on metal resistant and non-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 3, p. 3233–3255, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3987032/>. Acesso em: 15 out. 2018.

CHRISTENSEN, H. *et al.* Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the *rrs* gene within the Pasteurellaceae, **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, p. 1601–1609, 2004. Disponível em: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/54/5/1601.pdf?expires=1537881292&id=id&accname=guest&checksum=671868EA5C731CBAAEDB8FC116218172>>. Acesso em: 25 set 2018.

CRUZ, A. T.; CAZACU, A. C.; ALLEN, H. C. *P. Agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 6, p. 1989-1992, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1933083/>. Acesso em: 02 ago. 2017.

CURITIBA. Vigilância Sanitária investiga suspeita de contaminação em nutrição parenteral. **Agência de Notícias da Prefeitura**, Curitiba, 19 nov. 2013. Disponível em:

<http://www.curitiba.pr.gov.br/noticias/vigilancia-sanitaria-investiga-suspeita-de-contaminacao-em-nutricao-parenteral/31350>. Acesso em: 01 nov. 2018.

DIECKMANN, R. *et al.* Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). **Appl Microbiol and Biotechnol**, v. 67, n. 4, p. 539-548, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-004-1812-2>. Acesso em: 28 set. 2018.

DIONÍSIO, B. Empresa de bolsas para nutrição intravenosa fará recall em hospitais. **G1 PR**. Curitiba, 22 jan. 2014. Disponível em: <http://g1.globo.com/pr/parana/noticia/2014/01/empresa-de-bolsas-para-nutricao-intravenosa-fara-recall-em-hospitais.html>. Acesso em: 01 nov. 2018.

DISSANAIKE, S. *et al.* The risk for bloodstream infections is associated with increased parenteral caloric intake in patients receiving parenteral nutrition. **Crit Care**, v. 11, n. 5, R114, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17958913>. Acesso em: 15 out. 2018.

DOIT, C. *et al.* Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in a pediatric hospital due to contamination of lipid emulsion stoppers. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 2227-2230, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC404641/>. Acesso em: 24 maio 2017.

DUDRICK, S. J.; WILMORE, D. W.; VARS, H. M.; RHOADS, J. E. Long-term total parenteral nutrition with growth, development and positive nitrogen balance. **Surgery**, v. 64, p. 134-142, 1968. Disponível em: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3256.pdf>. Acesso em: 20 maio 2017.

DUDRICK, S. J. History of parenteral nutrition. **J Am Coll Nutr**, v. 28, n. 3, p. 243-251, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150597>. Acesso em: 20 maio 2017.

DUNNE, W. M.; TILLMAN, J. MURRAY, J. C. Recovery of a strain of *Agrobacterium radiobacter* with a mucoid phenotype from an immunocompromised child with bacteremia. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 9, 1993. Disponível em: <http://pubmedcentralcanada.ca/pmc/articles/PMC265809/pdf/jcm00021-0307.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2017.

EDMOND *et al.* *Agrobacterium radiobacter*: a recently recognized opportunistic pathogen. **Clin Infect Dis**, v. 16, n. 3, p. 388-391, 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8452950>. Acesso em: 30 jul. 2017.

ELAMIN, A.; NORRI, A. Essentials of parenteral nutrition: a review. **Sudan JMS**, v. 5, n. 1, p. 53-61, 2010. Disponível em: [http://www.sudjms.net/issues/5-1/pdf/10\)Essentials%20of%20Total%20Parenteral%20Nutrition%20A%20review.pdf](http://www.sudjms.net/issues/5-1/pdf/10)Essentials%20of%20Total%20Parenteral%20Nutrition%20A%20review.pdf). Acesso em: 20 maio 2017.

ELMAN, M. D. R.; WEINER, D. O. Intravenous alimentation with special reference to protein (amino acid) metabolismo. **K Am Med Assoc**, v. 112, p. 796, 1939.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v. 1. p. 250-263; 319.

FOREST, J. Bacteria in dripfeed killed children: Treatment for leukaemia had lowered victims' immunity. **Independent**. Londres, 23 abr. 1994. Disponível em: <https://www.independent.co.uk/news/uk/bacteria-in-dripfeed-killed-children-treatment-for-leukaemia-had-lowered-victims-immunity-jonathan-1371808.html>. Acesso em: 28 nov. 2018.

FORSYTHE, S. J.; ABBPTT, S. L.; PITOUT, J. *Klebsiella, enterobacter, citrobacter, cronobacter, serratia, plesiomonas*, and other enterobacteriaceae. In: **MANUAL of clinical microbiology**. 11. ed. Washington: ASM Press, 2015. p. 714-737.

FOX, G. E. et al. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **Int J Syst Bacteriol**, v. 42, n. 1, p. 166-170, 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371061>. Acesso em: 01 fev. 2019

FRANK, J. A. et al. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial *rrs* Genes. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 8, p. 2461-2470, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2293150/>. Acesso em: 06 ago. 2017.

FREAN, J. A. et al. Investigation of contaminated parenteral nutrition fluids associated with an outbreak of *Serratia odorifera* septicaemia. **J Hosp Infect**, v. 27, n. 4, p. 263-273, 1994. Disponível em: [https://www.journalofhospitalinfection.com/article/0195-6701\(94\)90114-7/pdf](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/0195-6701(94)90114-7/pdf). Acesso em: 14 nov. 2018.

FRIGATTO, E. A. M.; FERNANDES, S. A.; VAZ, T. M. I. **Curso de Microbiologia Clínica**: módulo 2: Gram-negativos fermentadores. Brasília: ANVISA, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/MODULO2/resistencia.htm. Acesso em: 31 out. 2017.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. INSTITUTO OCTÁVIO MAGALHÃES. Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental. **Manual de coleta de amostras**. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: http://funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2011/05/Manual_Divisa_2011.p

df. Acesso em: 15 out. 2018.

G1 PR. **Empresa que fabrica bolsas para nutrição intravenosa é interdita**. Curitiba: G1 PR, 19 nov. 2013. Disponível em: <http://g1.globo.com/pr/parana/noticia/2013/11/empresa-que-fabrica-bolsas-para-nutricao-intravenosa-e-interditada.html>. Acesso em: 01 nov. 2018.

GARRITY, G. M. A New Genomics-Driven Taxonomy of Bacteria and Archaea: Are We There Yet? **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 8, p. 1956-1963, 2016. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/54/8/1956.full.pdf>. Acesso em: 24 set. 2018.

GERHARDT, P. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1994. 690p.

GEVERS, D. et al. Re-evaluating prokaryotic species. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005. Disponível em: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-23944437942&origin=inward&txGid=47e872714645c95723405ed190314765>. Acesso em: 25 set. 2018.

GILBERT, M.; GALLAGHER, S. C.; EADS, M.; ELMORE, M. F. Microbial growth patterns in a total parenteral nutrition formulation containing lipid emulsion. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 10, n. 5, p. 494-497, 1986. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3093706>. Acesso em: 17 maio 2017.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Syste Appli Microbiol**, v. 38, n. 4 p. 237-245, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202015000508?via%3Dihub>. Acesso em: 24 set. 2018.

GONÇALVES, C. R. *et al.* Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med trop S. Paulo**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v42n1/v42n1a01.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2017.

GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**, v. 1, n. 3, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2013.11.21.001>. Acesso em: 03 ago. 2017.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. Genus: *Enterobacter*; *Pantoea*. In: THE PROTEOBACTERIA, part b: the gammaproteobacteria. v. 2.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. Michigan: Springer, 2005. v. 2, pt. B, p. 661-669; 713-722.

GUDUCUOGLU, J. *et al.* Outbreak *Candida albicans* associated with total parenteral nutrition in the neonatal unit. **Indian J Med Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 202-207, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27080773>. Acesso em: 25 maio 2017.

GUO, Y. *et al.* A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus rrs* gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, p.149–159, 2008. Disponível em: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/58/1/149.pdf?expires=1539106200&id=id&accname=guest&checksum=93A61390F92307A88918B991D4120494>. Acesso em: 09 out. 2018.

HABSAH, H. *et al.* An outbreak of *Pantoea* spp. in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition. **J Hosp Infect**, v. 61, n. 3, p. 213-218, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670105000472>. Acesso em: 23 maio 2017.

HATA, H. *et al.* Phylogenetics of family *Enterobacteriaceae* and proposal to reclassify *E. hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. **Microbiol Immunol**, v. 60, n. 5, p. 303-311, 2016. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1348-0421.12374/abstract;jsessionid=7B4026F895C62A7F780B388785448395.f03t01>>. Acesso em: 03 ago. 2017.

INOUE, K. *et al.* *Enterobacter cowanii* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae. **Curr Microbiol**, v. 41, n. 6, p. 417-420, 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s002840010160.pdf>. Acesso em: 11 out. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Relatório de Atividades 2013-2016**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/.../20170425_relatorio-web-final.pdf. Acesso em: 01 nov. 2018.

JARVIS, W. R. *et al.* Polymicrobial bacteremia associated with lipid emulsion in a neonatal intensive care unit. **Pediatr Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 203-208, 1983. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6408618>. Acesso em: 20 maio 2017.

JURINKE, C.; OETH, P.; VAN DEN BOOM, D. MALDI-TOF Mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. **Mol Biotech**, v. 26, p. 147-163, 2004.

KÄMPFER, P. et al. *Kosakonia pseudosacchari* sp. nov., an endophyte of *Zea mays*. **Syst Appl Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597455>. Acesso em: 12 out. 2018.

KIM, M. *et al.* Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and *rrs* gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **Inter J Syst Evol Microbiol**, 64, p. 346-351, 2014. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijso.0.059774-0#r28>. Acesso em: 13 out. 2018.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 5, p. 504-509, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527407001208>. Acesso em: 13 out. 2018.

KOO, H. S. *et al.* Pseudooutbreak da bacteremia das espécies de *Pantoea* associada a pedaços de algodão contaminado. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 7, p. 443-446, 2006. Disponível em: [http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(06\)01019-4/fulltext](http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(06)01019-4/fulltext). Acesso em: 03 ago. 2017.

KÔSE, S. *et al.* *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in neonatal intensive care unit due to contaminated total parenteral nutrition solution. **J Pediatr Research**, v. 3, n. 2, p. 109-112, 2016. Disponível em: <http://cms.galenos.com.tr/FileIssue/16/960/article/109-112.pdf>. Acesso em: 20 mai.2017.

KUWAHARA, T. *et al.* Growth of microorganisms in total parenteral nutrition solutions containing lipid. **Int J Med Sci**, Tokushima, v. 7, n. 3, p. 101-109, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2880838/#B1>. Acesso em: 17 maio.2017.

LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ. **Manual de coleta e envio de amostras de Vigilância Sanitária**. Curitiba, 2014. Disponível em: http://www.lacen.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Manuais/Manual_Envio_Coleta_Amostras_Vigilancia_Sanitaria_2014.pdf. Acesso em: 15 out. 2018.

LAI, C. C. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of *Rhizobium radiobacter* infections. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 1, p. 149-153, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/38/1/149/355862/Clinical-and-Microbiological-Characteristics-of>. Acesso em: 31 jul. 2017.

LANE, D. J. *et al.* Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413450/>. Acesso em: 06 ago. 2017.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In*: STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW, M. (ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LE FLÈCHE-MATÉOS, A. *et al.* *Rouxiella chamberiensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Enterobacteriaceae isolated from parenteral nutrition bags. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 65, n. 6, p. 1812-1818, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747423>. Acesso em: 26 nov. 2018.

LEMOS, J. B.; RODRIGUES, M. E. B.; LOPES, J. P. Diagnóstico de ectoparasitas e bactérias em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região de Paulo Afonso, Bahia. **Rev Bras Eng Pesca**, v. 1, n. 1, 2006. Disponível em: <http://ppg.revistas.uema.br/index.php/REPESCA/article/view/19/14>. Acesso em: 13 out. 2018.

LEWIS, A. **Standard bags for paediatric patients**. England: University Hospital of Wales, 2017. Disponível em: <http://nppg.org.uk/wp-content/uploads/2018/02/2017ALew.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2018.

LIRA, R. S. **Validação de teste de esterilidade baseado em detecção de dióxido de carbono**. 2013. 97f. Dissertação. (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-11112014-091025/pt-br.php>. Acesso em: 01 maio 2017.

LLOP, J. M.; MANGUES, I.; PEREZ, J. L.; LOPEZ, P.; TABAU, M. *Staphylococcus saprophyticus* sepsis related to total parenteral nutrition admixtures contamination. **J Parenter Enteral Nutr**, Barcelona, v. 17, n. 6, p. 575-577, 1993.

MCCLAVE, S. A. *et al*; American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). **J Parenter Enteral Nutr**, v. 33, n. 3, p. 277-316, 2009.

MAKI, D. G.; MARTIN, W. T. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated infusion products. IV. Growth of microbial pathogens in fluids for intravenous infusion. **J Infect Diseases**. Atlanta, v. 131, n. 3, p. 267-272, mar. 1975.

MALTEZOU, H. C. *et al.* Consecutive *Serratia marcescens* multiclone outbreaks in a

neonatal intensive care unit. **Am J of Infect Control**, Atenas, v. 40, p. 637-42, 2012. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264746>. Acesso em: 20 maio 2017.

MARTA, R. *et al.* Peritonitis due to *Rhizobium radiobacter*. **Einstein**, v. 9, n. 3, p. 389-390, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/eins/v9n3/1679-4508-eins-9-3-0389.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2017.

MARTIN, G. S. *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700374/>. Acesso em: 06 ago. 2017.

MASCARENHAS, M. B. J. *et al.* Soluções de nutrição parenteral neonatal em hospital de ensino brasileiro: da indicação à administração. **Rev Bras Farm Hosp Serv Saúde**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 18-23, 2015. Disponível em: <http://www.sbrafh.org.br/rbfhss/public/artigos /2015060204000739BR.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2017.

MCKEE, K. T. *et al.* Gram-negative bacillary sepsis associated with use of lipid emulsion in parenteral nutrition. **Am J Dis Child**, Nashville, v. 133, p. 649-650, 1979. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/375720>. Acesso em: 20 maio 2017.

MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. Review *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiol**, v. 7, n. 7, p. 887-902, 2012. Disponível em: https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.12.61?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=fmb. Acesso em: 12 out. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Segurança do Paciente. 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/1243-sas-raiz/dahu-raiz/dahu/seguranca-do-paciente/seguranca-do-paciente-12/28063-apresentacao-programa-nacional-de-seguranca-do-paciente>. Acesso em: 25 jun. 2017.

MONTALVO-JAVE, E. E.; ZARRAGA, J. L.; SARR, M. G. Specific topics and complications of parenteral nutrition. **Langenbecks Arch Surg**, v. 392, n. 2, p. 119-126, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17221268>. Acesso em: 25 jun. 2017.

MORAES, P. M. *et al.* Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. **Braz J Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 109-112, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000100015&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 08 out. 2018.

MOUSAVI, S. A *et al.* Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. **Syst Appl Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 84–90, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S072320201400191X?via%3Dihub>. Acesso em: 02 out. 2018.

MÜHLEBACH, S.; FRANKEN, C.; STANGA, Z. Practical handling of AIO admixtures - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 10. **GMS German Med Sci**, v. 7, doc. 18, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2795373/>. Acesso em: 20 maio 2017.

OCTAVIA, S.; LAN, R. The Family Enterobacteriaceae. *In*: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (ed.). **The Prokaryotes: Gammaproteobacteria**. New Delhi: CBS Publishers, 2014, p. 225-226. Disponível em: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-38922-1_167. Acesso em: 16 out. 2017.

O'DWYER, G.; REIS, D. C. S.; SILVA, L. L. G. Integralidade, uma diretriz do SUS para a vigilância sanitária. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 3351-3360, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232010000900010&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 15 out. 2018.

OPILLA, M. Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. **Am J Infect Control**, v. 36, n. 10, p. 5-8, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084152>. Acesso em: 15 out. 2018.

ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. **Syst Appl Microbiol**, v. 38, n. 4, p. 287-291, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202014001908>. Acesso em: 02 out. 2018.

OTTO, T. D. *et al.* ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genet Mol Res**, v. 7, p. 861-871, 2008

PANDAY, D.; SCHUMANN, P.; DAS, S. K. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, p. 2632–2639, 2011. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.028407-0#tab2>. Acesso em: 02 out. 2018.

PARTE, A.C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 68, p. 1825-1829, 2018. Disponível

em: 10.1099/ijsem.0.002786. Acesso em: 02 out. 2018.

PRAKASH, O. *et al.* Polyphasic approach of bacterial classification — An overview of recent advances. **Indian J Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 98-108, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3450112/>. Acesso em: 06 ago. 2017.

PEREIRA *et al.* Conceitos, indicações e contraindicações em nutrição parenteral. In: CALIXTO-LIMA *et al.* **Manual de nutrição parenteral**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. p. 11-12.

PETTI, C. A.; RELLER, B. L.; WEINSTEIN, M. P. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 8, p. 1108-1114, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/512818>. Acesso em: 30 out. 2017.

PILLONETTO, M. *et al.* Emended description of the genus *Phytobacter*, its type species *Phytobacter diazotrophicus* (Zhang 2008) and description of *Phytobacter ursingii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 68, n. 1, p. 176-184, 2017. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002477#tab2>. Acesso em: 12 out. 2018.

PILLONETTO, M. *et al.* Molecular investigation of isolates from a multistate polymicrobial outbreak associated with contaminated total parenteral nutrition in Brazil. **BMC Infect Dis**, v. 18, n. 397, 2018. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3287-2>. Acesso em: 24 set. 2018.

PINCUS, D. H. Microbial identification using the biomérieux VITEK® 2 System. In: MILLER, M. J. (ed.). **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Silver Spring: PDA e DHI Publishing, 2013. v. 4. Disponível em: https://store.pda.org/tableofcontents/ermm_v2_ch01.pdf. Acesso em: 08 out. 2018.

POTVLIEGE, C.; VANHUYNEGEM, L.; HANSEN, W. Catheter infection caused by an unusual pathogen, *Agrobacterium radiobacter*. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 9, p. 2120-2122, 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2778076>. Acesso em: 31 jul. 2017.

PRIMO, L. P. *et al.* Reestruturação física e revisão de processos do Centro de Preparo de Nutrição Parenteral como ferramenta de melhoria da qualidade de assistência farmacêutica do HCFMRP-USP. São Paulo, **Rev. Qualidade HC**, n. 3, p. 137-140, 2012. Disponível em: <http://www.hcrp.usp.br/revistaqualidadehc/uploads/Artigos/89/89.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2017.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. Press release: *Bacillus cereus* infections, Publication of the main findings from the PHE and MHRA investigation into the *Bacillus cereus* outbreak. **PHE Press Office infections**, Londres, 01 jul. 2014. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/news/bacillus-cereus-infections-1-july-2014>. Acesso em: 14 nov. 2018.

RAINEY, F. A. et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardiopsaceae fam. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 46, n. 4, p. 1088-1092, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8863440>. Acesso em: 09 out. 2018.

RIO DE JANEIRO (Estado). Subsecretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica SVS/Nº 007/2013**. Nota Técnica sobre a ocorrência de surtos infecciosos associados à nutrição parenteral em dois estados do Brasil com possível repercussão no Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.aeciherj.org.br/publicacoes/Informativos-CCIH/Nota-Tecnica-SVS.007.2013.pdf> Acesso em: 25 out. 2016

RODBY, R. A.; GLICK, E. J. *Agrobacterium radiobacter* peritonitis in two patients maintained on chronic peritoneal dialysis. **Am J Kidney Dis**, v. 18, n. 3, p. 402-405, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1882836>. Acesso em: 31 jul. 2017.

ROMBEAU, J. L.; ROLANDELLI, R. H. **Nutrição clínica: nutrição parenteral**. 3. ed. São Paulo: Roca. 2005, p. 123-124.

ROSSI-TAMISIER, M. et al. Cautionary tale of using *rrs* gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. **Inter J Syst Evol Microbiol**, v. 65, p. 1929-1934, 2015. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.000161#tab2>. Acesso em: 13 out. 2018.

RYZHOV, V.; FENSELAU, C. Characterization of the Protein Subset Desorbed by MALDI from Whole Bacterial Cells. **Anal Chem**, v. 73, n. 4, p. 746-750, 2001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac0008791#citing>. Acesso em: 28 set. 2018.

SACKS, G. S. Microbial contamination of parenteral nutrition – how could it happen? **J. Parenter Enteral Nutr**, Alabama, v. 35, n. 4, p. 432, 2011. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0148607111412193>. Acesso em: 20 maio 17.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, n. 406-425, 1987.

SANGER *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci**

USA, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/pnas/74/12/5463.full.pdf>. Acesso em: 24 set. 2018.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Syst Appl Microbiol**, v. 32, p. 533-542, 2009. Disponível em: <https://www.science-direct.com/science/article/pii/S0723202009001258>. Acesso em: 24 set. 2018.

SHEPPARD, A. E. *et al.* Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene blaKPC. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 6, p. 3767-3778, 2016. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/60/6/3767.long>. Acesso em: 10 out. 2018.

SOUTO, C. R. **Avaliação dos Medicamentos Injetáveis encaminhados ao INCQS no período de janeiro de 2000 a junho de 2006 pelas vigilâncias sanitárias municipais, estaduais e ANVISA.** 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

SPINALI, S. *et al* Microbial Typing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Do We Need Guidance for Data Interpretation?. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 760-765, 2015. Disponível: <https://jcm.asm.org/content/53/3/760.long>. Acesso em: 28 set. 2018.

SRINIVASAN, R. *et al.* Use of *rrs* Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. **Plos One**, v. 10, n. 2, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4319838/>. Acesso em: 06 ago. 2017.

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiol Today**, v. 4, p. 152–155; 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285376153_Taxonomic_parameters_revisited_Tarnished_gold_standards. Acesso em: 01 fev. 2019.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int J Syst Bacteriol**, v. 44, p. 846–849, 1994. Disponível em: <https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-44-4-846>. Acesso em: 01 fev. 2019.

SUTTON, V. W. S. The compendial sterility tests. IN: NEMA, S.; LUDWIG, J. D. **Pharmaceutical dosage forms: parenteral medications.** 3. ed. New York: Informa Healthcare, 2010. v. 2.

SUTTON, V. W. S. The compendial sterility tests. **Microbiology Network Blog**, 18 out. 2013. Disponível em: <http://blog.microbiologynetwork.com/530/the-compendial-sterility-tests/>. Acesso em: 15 jan. 2013.

TIWARI, S.; BERIHA, S. S. *Pantoea* species causing early onset neonatal sepsis: a case report. **J Med Case Rep**, v. 9, n. 188, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4560869/>. Acesso em 28 nov. 2018.

TRAJANO, H. B. P.; CALDAS, C. P. Uso de antimicrobianos em idosos hospitalizados com infecção do trato urinário. **Rev Hosp Univ Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 7, n 1, p. 116-126, 2008. Disponível em: http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=198. Acesso em: 28 mai. 2017.

TRAN-DIEN, A. *et al.* Early transmissible ampicillin resistance in zoonotic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the late 1950s: a retrospective, whole-genome sequencing study. **Lancet Infect Dis**, v. 18, n. 2, p. 207-214, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29198740>. Acesso em: 15 out. 2018.

TRESOLDI *et al.* *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. **Am J Infect Control**, v. 28, n. 3, p. 258-261, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655300623106>. Acesso em: 23 mai. 2017.

TRISSEL, L.A. *et al.* Using a medium-fill simulation to evaluate the microbial contamination rate for USP medium-risk-level compounding. **Am J Health Syst Pharm**, v. 62, p. 285-288, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719586>. Acesso em: 31 jan. 2019.

TRISOTTO, F.; SENKOVSKI, A. Vigilâncias sanitárias investigam contaminação de alimentação intravenosa. **Gazeta do Povo**, Curitiba, 19 nov. 2013. Disponível em: <https://www.gazetadopovo.com.br/vida-e-cidadania/vigilancias-sanitarias-investigam-contaminacao-de-alimentacao-intravenosa-390rwyj321ih3xhdhwj1uhsevi/>. Acesso em: 01 nov. 2018.

TURNIDGE, J. D. Susceptibility Test Methods: General Considerations. *In: MANUAL of Clinical Microbiology*. 11. ed. Washington: ASM Press, 2015. p. 1246-1251

TURPIN, R. S. *et al.* Bloodstream infections associated with parenteral nutrition preparation methods in the United States. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 36, n. 2, p. 169-176, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1177/0148607111414714>. Acesso em: 12 out. 2018.

THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2016. v. 1, p. 1325-1327.

VANEECHOUTTE, M. *et al.* *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: MANUAL of Clinical Microbiology. 11. ed. Washington: ASM Press, 2015. p. 823-825

VAN ROSTENBERGHE, H. *et al.* The clinical picture of neonatal infection of *Pantoea* species. **Jpn J Infect Dis**, v. 59, n. 2, p. 120-121, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632913>. Acesso em: 20 mai. 2017.

VEGAS, E. Z. S. *et al.* Outbreak of Infection With *Acinetobacter* Strain RUH 1139 in an Intensive Care Unit. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, n. 4, p. 397-403, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/7157150_Outbreak_of_Infection_With_Acinetobacter_Strain_RUH_1139_in_an_Intensive_Care_Unit. Acesso em: 14 nov. 2018.

VERSCHRAEGEN, G. *et al.* Serotyping and phage typing to identify *Enterobacter cloacae* contaminating total parenteral nutrition. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 306-307, 1988. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3134237?dopt=Abstract>. Acesso em: 14 nov. 2018.

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The Variability of the *rrs* Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. **Plos One**, v. 8, n. 2, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>. Acesso em: 24 set. 2018.

VIDAL, L. M. R. **Caracterização de cocos Gram positivos provenientes de análises microbiológicas de produtos farmacêuticos estéreis realizadas no INCQS/FIOCRUZ**. 2013. 138 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

VILLAFRANCA, J. J. A.; SÁNCHEZ, A. G.; GUINDO, M. N.; FELIPE, V. F. Using failure mode and effects analysis to improve the safety of neonatal parenteral nutrition. **Am J Health-Syst Pharm**, v. 71, n. 15, p. 1210-1218, 2014. Disponível em: <http://www.ajhp.org/content/71/14/1210>. Acesso em: 04 jun. 2017.

VONBERG, R.P.; GASTMEIER, P. Hospital-acquired infections related to contaminated substances. **J Hosp Infect**, v. 65, n. 1, p. 15-23, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145102?dopt=Abstract>. Acesso em: 15 out. 2018.

WANG, J. *et al.* Identification and Cluster Analysis of *Streptococcus pyogenes* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, e47152, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047152>. Acesso em: 28 set. 2018.

WATTS, J. L. *et al.* Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. **J Dairy Sci**, v. 83, n. 10, p. 2373-2379, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030200751265?via%3Dihub>. Acesso em: 09 out. 2018.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1987160/>. Acesso em: 06 ago. 2017.

WILLIAMS, W. *et al.* Infection Control during Parenteral Nutrition Therapy. **J of Parenter Enterol Nutr**, v. 9, n. 6, 1985, 735-746, 1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934408>. Acesso em: 29 abr. 2017.

WINN, W. C. *et al.* **Koneman diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

WRETLIND, A; SZCZYGIEL, B. Total parenteral nutrition. History. Present time. Future. **Pol Merkur Lekarski.**, v. 4, n. 22, p. 181-185, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9770991>. Acesso em: 29 abr. 2017.

YANG, X. J. *et al.* Complete genome sequence of human pathogen *Kosakonia cowanii* type strain 888-76^T. **Braz J Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 16-17, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1517-83822018000100016&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 14 out. 2018.

YOON, S. H. *et al.* Introducing ezbiocloud: a taxonomically united database of *rrs* and whole genome assemblies. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 67, p. 1613-1617, 2017. Disponível em: <https://www.ezbiocloud.net>. Acesso em: 02 out. 2018.

YOUNG, J. M. *et al.* A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. Rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, p. 89-103, 2001. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-1-89>. Acesso em: 02 out. 2018.

ZHANG, G. X. *et al.* Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice

oryza rufipogon and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Arch Microbiol**, v. 189, n. 5, p. 431-439, 2008. Disponível em: [https://link.springer.com/article/10.1007 %2fs00203-007-0333-7#citeas](https://link.springer.com/article/10.1007%2fs00203-007-0333-7#citeas). Acesso em: 10 out. 2018.

ZINGG, W.; TOMASKE, M.; MARTIN, M. Risk of parenteral nutrition in neonato: an overview. **Nutrients**, v. 4, n. 10, p. 1490-1503, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3497007/>. Acesso em: 23 maio 2017.

ANEXO A

Amostra N° _____	
Produto: _____ Lote: _____ Data de Fabricação: ___/___/___ Data de Validade: ___/___/___ Quantidade da amostra (volume): _____	
Modalidade de análise: () Fiscal () Orientação Motivo da Apreensão: _____ Fabricante: _____ Logradouro: _____ Local de coleta: _____ VISA responsável pela coleta: _____ Requerente da análise: _____ Foi feita alguma solicitação a VISA? _____ Unidades analíticas selecionadas: () DQ () DM () DFT	
Data de apreensão: ___/___/___ N° TAA: _____ Dados sobre o preenchimento do TAA: _____ _____ Documentos em anexo ao processo: _____ _____ _____	
Data de entrada: ___/___/___ Data de liberação do laudo analítico: ___/___/___ OBS: _____ _____ _____	

Fonte: (Adaptado de SOUTO, 2008).