



IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS EM AMBIENTE HOSPITALAR NO MUNICÍPIO DE CUITÉ-PB.

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

RESUMO

Um dos desafios encontrados em todo o mundo é o aumento dos tipos de resistências antimicrobianas, tendo em vista que as bactérias estão por toda parte e quando patogênicas desenvolvem infecções no hospedeiro humano. Em ambientes hospitalares causam repercussões irreversíveis, algumas vezes, incontroláveis pelos órgãos de saúde. A pesquisa objetivou identificar microrganismos bacterianos em amostras de ambientes hospitalares e analisar possíveis linhagens resistentes a antimicrobianos no município de Cuité-PB. Metodologicamente, as amostras em triplicatas foram coletadas em seis pontos diferentes do Hospital, posteriormente foi realizado o cultivo, contagem e isolamento de linhagens, bem como triagem antibacteriana em diferentes concentrações de Ampicilina. Para análise das amostras, foram realizadas técnicas como: extração de DNA, Reação em cadeia da Polimerase utilizando marcadores de RAPD e o gene ribossômico 16S. Os resultados obtidos evidenciaram alto grau de contaminação das superfícies avaliadas, levando em consideração o número elevado de colônias por placa e a variabilidade fenotípica das amostras, fato que demonstra a grande necessidade de biomonitoramento e limpeza adequada dos locais. A triagem antibacteriana com ampicilina apresentou resistência significativa, e as técnicas moleculares, como as análises dos perfis de RAPD nos isolados bacterianos se mostraram promissoras. Em síntese, é importante a preocupação com relação ao uso indiscriminado de antibióticos pela sociedade bem como a higiene dos ambientes e corpo clínico, principalmente, em áreas de alto contato. A compreensão da população microbiana presente no âmbito hospitalar é de grande importância científica, social e econômica, pois auxilia na tomada de decisões e soluções pelo poder público.

Palavras-chave: Bactérias, Resistência, Ambiente hospitalar.

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

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

IDENTIFICATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANT BACTERIA IN HOSPITAL ENVIRONMENT IN THE CITY OF CUITÉ-PB.

ABSTRACT

One of the challenges found around the world is the increase in the types of antimicrobial resistance, considering that bacteria are everywhere and when pathogens develop, they occur in the human host, in hospital environments they cause irreversible, sometimes uncontrollable, repercussions for health agencies. A research aimed to identify bacterial microorganisms in hospital environments and identify possible strains resistant to antimicrobials in the city of Cuité-PB. Methodologically, as triplicates were collected in six different points of the Hospital, the cultivation, counting and isolation of strains was subsequently carried out, as well as antibacterial screening at different levels of Ampicillin. Techniques such as: DNA extraction, Polymerase chain reaction using RAPD markers and the 16S ribosomal gene were performed to analyze the rescued ones. The results obtained evidenced the high degree of contamination of the surfaces evaluated, taking into account the high number of colonies per plate and the phenotypic variability of the previous ones, a fact that demonstrates the great need for biomonitoring and local cleaning. Antibacterial screening with ampicillin showing resistance, and molecular techniques such as the analysis of RAPD profiles of bacterial high if high are promising. In summary, it is important to be concerned about the indiscriminate use of antibiotics by society, as well as the hygiene of environments and clinical staff, especially in areas of high contact. The understanding of the microbial population present in the hospital environment is of great scientific, social and economic importance, as it helps the public authorities to take decisions and solutions.

Keywords: Bacteria, Resistance, Hospital environment.

INTRODUÇÃO

As infecções associadas aos cuidados de saúde (HAIs) propiciam internações hospitalares prolongadas, aumento da mortalidade bem como elevados custos. De um modo geral, o paciente internado está sujeito a diversas terapias medicamentosas que afetam o sistema imune e o torna susceptível a adquirir infecção hospitalar, exemplificada pelo caráter oportunista das bactérias afetando organismos que já estão imunossuprimidos, como exemplo disso são as infecções secundárias em pacientes com COVID-19 que estão internados em unidades de terapia intensiva. Além disso, há fatores que favorecem essas infecções, como a transmissão de microrganismos por superfícies, pias, bebedouros, leitos e mãos de profissionais contaminados com bactérias patogênicas, podendo desencadear maiores surtos de HAIs (BOADA *et al.*, 2018; ASMARAWATI *et al.*, 2021; KOCH, 2015).

Uma variedade de patógenos microbianos infecciosos já são resistentes à maioria das classes de antibióticos clinicamente utilizáveis, diminuindo fortemente as opções de tratamentos alternativos, que às vezes são simplesmente inexistentes. Os mecanismos de resistência adotados pelas bactérias envolvem mutações genéticas e aquisição de genes, assim, essas estratégias evolutivas ou por transferência lateral entre microrganismos no mesmo ambiente, fazem com que um microbioma hospitalar aumente as taxas de infecções (SZE; SCHLOSS, 2019).

Um dos desafios encontrados no sistema de saúde pública em todo o mundo é o aumento do número e dos tipos de resistências antimicrobianas, o uso e mau uso de antimicrobianos na medicina é uma das principais causas desse problema crescente (PÉREZ-ETAYO *et al.*, 2020). Pacientes hospitalizados que utilizam tratamento com antibióticos expressam boas condições para o desenvolvimento de resistência devido à alta pressão seletiva, ademais, ambientes hospitalares são locais onde se encontram excelentes habitats para bactérias adquirirem resistência aos antibióticos (LÉPESOVÁ *et al.*, 2020).

Cerca de 1% das bactérias encontradas em determinado ambiente representam metade dos filós bacterianos conhecidos, isso significa dizer que existe uma vasta gama oculta de diversidade que nunca foi vista antes (LAGIER *et al.*, 2015). Fundamentado nisso, habitats hospitalares começaram a ser investigados com tecnologias de sequenciamento com alto rendimento de DNA, na tentativa de identificar e caracterizar a composição daquele local. Essas abordagens são respaldadas em métodos de microbiologia e genética molecular dependentes e independentes de cultivo, sendo possível acessar informações do material genético através de uma simples amostra por metagenômicas.

O sequenciamento de DNA permite que as bactérias sejam identificadas via sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA, um gene curto e conservado específico para o gênero bacteriano capaz de diferenciar os organismos (MUHAMAD RIZAL *et al.*,

2020). O ensaio de PCR específico deste gene é útil na caracterização detalhada do patógeno causador, mesmo em infecções polibacterianas, presença de bactérias fastidiosas e incultiváveis na amostra (BEHERA *et al.*, 2021). Apesar dessa possibilidade essas técnicas não são baratas nem usuais em análises desse tipo, dificultando substancialmente a sua realização em larga escala. De todo modo, várias técnicas da biologia e genética molecular utilizadas atualmente possibilitam descobrir microbiomas ocultos e revelar sua distribuição onipresente, contribuindo assim para a identificação e possibilidade da manutenção de níveis mais baixos de infecções auxiliando na melhoria da assistência à saúde.

O trabalho utiliza métodos dependentes e independentes de cultivo microbiano, técnicas microbiológicas clássicas e análises metagenômicas permitindo a análise global dos microrganismos mais representativos do ambiente estudado. As amostragens foram realizadas no Hospital Municipal de Cuité-PB, nos locais mais utilizados pelos pacientes, como leitos, enfermarias, banheiros e recepções. Além disso, foram realizados testes com ampicilina, possibilitando a visualização de populações microbianas com capacidade de resistência em diferentes concentrações deste antibiótico. Com isso é possível se precaver e compreender o aparecimento de microrganismos resistentes que afetam a saúde humana em diversos locais bem como monitorá-los. O objetivo geral da pesquisa foi realizar um estudo de identificação de microrganismos bacterianos presentes em amostras de ambientes hospitalares e analisar possíveis linhagens resistentes a antimicrobianos no município de Cuité-PB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas e locais das amostragens

A amostragem foi realizada no Hospital Nossa Senhora das Mercês, situado na cidade de Cuité-PB. Em cada departamento foram selecionadas áreas de alto contato pelos pacientes e corpo clínico, incluindo itens e superfícies, como obstetrícia, pediatria, salas, postos de urgência, laboratórios e banheiros. As coletas foram realizadas em triplicatas com auxílio de SWABs e os locais foram nomeados de P1 a P6, onde cada um deles refere-se a um ambiente composto por subáreas. Sendo assim, os ambientes P1 e P2 são de setores próximos e foram coletadas amostras no banheiro maternidade (sanitário, pia, barra de segurar) e obstetrícia (berço, maca, equipamento), respectivamente. Os ambientes P3, P4 e P5 foram coletados na sala de urgência (bancada, armário, maca), no posto I (armário de medicação, mesa, maçaneta) e no laboratório (maçaneta, equipamento, bancada). Enquanto o P6 está em uma área mais afastada e foi coletada no setor de pediatria (pia, prateleira e armário).

Contagem e Cultivo dos Microrganismos

As bactérias obtiveram crescimento esperado em razão do meio de cultura rico em nutrientes que favoreceu o seu desenvolvimento. O meio LB (Luria Bertani) é

composto de 10g de Triptona, 5g de Extrato de Levedura, 10g NaCl e 1ml de NaOH 1N, quando sólido foi utilizado 40g de Ágar Bacteriológico para 1L de água destilada autoclavada. Posteriormente, as colônias de bactérias foram contadas, com a contribuição de uma lupa dispostas em quadrantes, facilitando esse processo. Algumas amostras passaram por diluição seriada, objetivando diminuir a quantidade de colônias presentes por placas, com isso foi determinado o fator de diluição que em seguida foi multiplicado pela quantidade de colônias existentes. O método de diluição simplificou a contagem, tornando-a mais acertada e precisa.

Seguidamente, os microrganismos foram isolados diante das suas características morfológicas para futuros testes moleculares. Esses isolados foram cultivados novamente em microtubos contendo 1,5 ml do meio LB líquido, onde cada um deles cresceu por três dias, o que favoreceu um aumento de células e DNA dos microrganismos, facilitando, assim, a extração do material genético.

Extração do DNA Metagenômico (DNAm)

O DNA metagenômico foi extraído dos seis ambientes e suas respectivas subáreas, totalizando dezoito extrações. O procedimento de extração de DNA total foi realizado pelo método CTAB.

Reações de PCR

Nas reações de PCR foram utilizados os primers 16S construídos (ISBA) bem como os RAPD (H-09 e N-15) já descritos por Santos *et al.*, 2010. Após a confirmação *in vitro* da eficiência dos primers desenvolvidos estes foram aplicados em larga escala nas amostras analisadas.

As Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas no termociclador BIOER Life touch (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd.) contendo as seguintes concentrações 2,5mM de MgCl₂, 10nmole de DNTPs, 40ng de DNA molde, 40pmole de cada Primer, 2Un de Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotech) e 2µl de Tampão de Enzima 10x, para um volume final de 20µl. O programa utilizado para as amplificações dos DNAs foi nomeado de RAPD rápido que consistiu em ciclos sucessivos de: desnaturação inicial de 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 30s, e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Os amplicons foram analisados em gel de agarose a 1,5% durante 1 hora a 80V e 80mA, corados com corante sybr gold, submetidos ao transiluminador de UV e fotodocumentados com o equipamento L-PIX.

Triagem da atividade antibacteriana da Ampicilina

O teste antimicrobiano com ampicilina foi realizado em microplacas dispendo de 96 poços fundo V, estéreis e resistentes a temperatura entre -10°C e 70°C. Para cada amostra, utilizou-se diferentes concentrações de 100ug/mL, 200ug/mL e 500ug/mL do antibiótico, além disso, foram realizados controles negativos (contendo meio de cultura)

e controles positivos (contendo meio de cultura juntamente com inóculo). O meio LB líquido foi inoculado com colônias bacterianas, que foram, posteriormente, incubadas a 37° C por 24 horas. As suspensões bacterianas foram padronizadas com 10 µl para cada teste, onde o inóculo foi diluído para uma concentração final de 250 µl de meio por poço. A avaliação da atividade antimicrobiana da ampicilina foi examinada através da visualização da turvação da cultura, sendo utilizada como uma indicação do crescimento bacteriano. Da mesma forma que a inibição do crescimento foi definida pela redução da turbidez da cultura.

Viabilidade

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

DESENVOLVIMENTO

Os patógenos responsáveis pela maioria das infecções neonatais invasivas são frequentemente resistentes aos antibióticos comumente usados, e muitos são resistentes a antibióticos de várias classes diferentes, incluindo medicamentos de último recurso, o que complica ainda mais e limita as possibilidades de tratamento (TUMUHAMYE *et al.*, 2021).

Superfícies hospitalares são altamente contaminadas com bactérias, que são uma fonte potencial de infecções nosocomiais. Um estudo realizado por Somia (2021) identificou comunidades bacterianas isoladas de superfícies hospitalares negligenciadas após rotina de limpeza em um hospital público argelino. A triagem de contaminação bacteriana no leito do paciente, telefones fixos de recepção, maçanetas e equipamentos médicos durante cinco meses gerou 108 inóculos. As Bactérias Gram negativas foram o grupo dominante (62,03%) representado principalmente por *Enterobacteriaceae* (42,59%), enquanto *Staphylococcus aureus* pertencentes a Gram positivas foi o principal patógeno expandido (15,74%).

Pesquisas com o patógeno *Acinetobacter baumannii* relatou o aumento do uso de antibióticos e de organismos resistentes a múltiplos medicamentos sendo um problema emergente nesta situação de pandemia. Os pacientes com COVID-19 que sofreram de infecção bacteriana têm um tempo de internação mais longo e têm maior mortalidade. Por conseguinte, a prática de controle de infecção deve ser estritamente conduzida para reduzir a infecção secundária ou associada aos cuidados de saúde (ASMARAWATI *et al.*, 2021).

A microbiologia clínica, os métodos dependentes de cultura permanecem altamente utilizados, uma vez que a grande maioria dos patógenos humanos

conhecidos são facilmente cultiváveis e podem estar presentes em quantidades extremamente baixas para serem detectados sem enriquecimento seletivo. Essas abordagens dependentes de cultura, no entanto, se concentram principalmente na identificação de microrganismos, obtendo resultados que provavelmente subestimarão a verdadeira diversidade microbiológica ao considerar o todo no contexto do ambiente (Lax *et al.*, 2017).

A amplificação por PCR de genes 16S rRNA é uma etapa crítica, embora subestimada, na geração de dados de sequência para descrever a composição taxonômica das comunidades microbianas. Desde a década de 1990, uma série de técnicas de marcadores moleculares genéticos baseados em DNA foram desenvolvidos, incluindo DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (SZE; SCHLOSS, 2019). Desde então, a técnica de RAPD isoladamente ou em combinação com outras técnicas é amplamente utilizada para a caracterização genética de diferentes plantas medicinais e microrganismos (FU, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que milhões de pessoas todos os anos são infectadas no âmbito hospitalar. Estas infecções podem ocorrer em decorrência da condição clínica do paciente, ausência da vigilância epidemiológica e sanitária, péssima educação em higienização pelos profissionais e do uso irracional ou inadequado dos antimicrobianos (FIOCRUZ, 2010; WHO, 2014; ANVISA, 2020). Abaixo são descritos os resultados obtidos com os experimentos empregados.

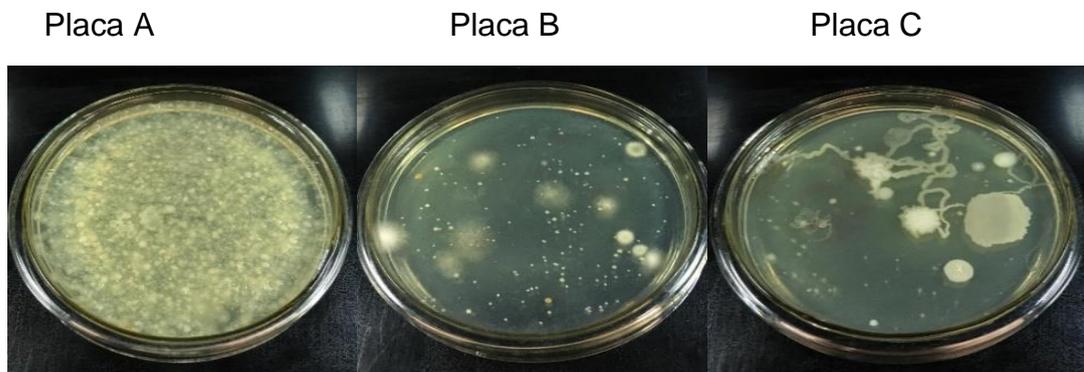
Contagem e Cultivo dos Microrganismos

À vista disso, microrganismos como as bactérias fazem parte da estrutura global, constituindo a microbiota terrestre que pode viver em associação harmônica ou não com outros organismos. Em ambientes hospitalares sua patogenicidade compromete a saúde das pessoas, ou ainda agrava os quadros desencadeando infecções secundárias. Nesta perspectiva, os resultados do cultivo bacteriano demonstraram uma diversidade de populações para as seis áreas analisadas do hospital. Isto expressa a relevância de conhecer a presença de potenciais cepas resistentes aos antibióticos bem como monitorar cada ambiente.

O quadro 1 apresenta o cultivo microbiológico de algumas das áreas que foram coletadas, podendo enxergar a heterogeneidade entre as espécies de bactérias presentes nas localidades do hospital. As placas A, B e C são referentes ao sanitário do banheiro da maternidade, mesa de recepção do posto de urgência e barra de segurar do banheiro, respectivamente. A placa "A" demonstrou uma variedade de colônias disponíveis, apresentando uma única característica morfológica, enquanto as demais placas revelam características morfológicas significativas. Esta gama de patógenos das mais variadas formas pode ser um dado preocupante onde cada um

deles pode possuir um certo grau de periculosidade, oferecendo riscos à saúde da população Cuiteense.

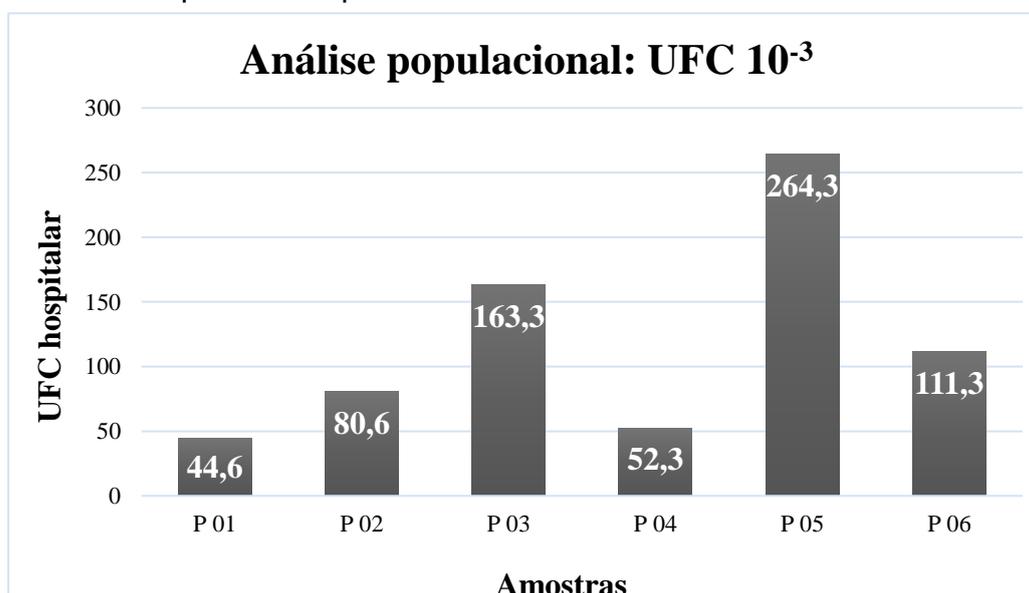
Quadro 1: Amostras do cultivo microbiano realizado com amostras do Hospital Municipal de Cuité. Placa A – sanitário; placa B – mesa de recepção; placa C – barra de segurança.



Fonte: Autoria própria.

Após o cultivo, foram realizadas contagens das populações pelas Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de cada departamento hospitalar, onde o ambiente 5 apresentou maior quantidade de microrganismos em relação aos demais, possuindo 246,3 UFCs, as amostras desse ambiente são especificamente do laboratório do Hospital. Por conseguinte, se sabe que a presença de bactérias é comum em superfícies inanimadas e equipamentos, e é por essa razão que as medidas de limpeza e desinfecção devem ser criteriosas, independente da restrição ao número de pessoas que frequentam aquele ambiente. Isto comprova que em todos os setores do hospital, sem exceção, devem ser realizadas rotinas de limpeza para melhora assegurar a qualidade sanitária desses microrganismos.

Gráfico 1: Análise populacional das Unidades Formadoras de Colônias de cada ambiente do Hospital Municipal de Cuité/PB.



Fonte: Aatoria Própria.

A contaminação de locais aparentemente limpos reforça a possibilidade da disseminação de patógenos, locais esses analisados como superfícies limpas, sem aparente sujidade, fazendo com que muitas vezes sejam ignoradas medidas eficazes de limpeza. O trânsito de pessoas, equipe de saúde, visitantes na unidade e, conseqüentemente, o contato com pacientes, objetos e superfícies aumenta a possibilidade de propagação de microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Portanto, é provável que no hospital de estudo, uma parcela bacteriana tenha ressurgido após a limpeza, bem como os métodos utilizados para limpar não tenham removido adequadamente as bactérias das superfícies. Isto é um pressuposto para que rotinas de limpeza e materiais e soluções utilizadas sejam revistas para melhor alcançar o objetivo que é a desinfecção dos ambientes.

Para este fim, o monitoramento microbiano de superfícies hospitalares pode ajudar a identificar áreas-alvo e melhorar a prevenção e controle de infecções (IPCs). Logo, a implementação de práticas de IPC pode ajudar a reduzir o risco de infecções. Contudo, foi visto que em alguns hospitais mesmo realizando a limpeza subótima, as superfícies permanecem contaminadas com patógenos microbianos (ODOYO *et al.*, 2021). Essa contaminação residual ocorre em parte porque muitos hospitais realizam apenas inspeções visuais dos ambientes hospitalares para avaliar os procedimentos de limpeza, ao invés do biomonitoramento efetivo utilizando técnicas mais apuradas de microbiologia ou até mesmo de genética molecular.

Uma nova pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Pernambuco deste ano, revelou que os locais que representam os maiores riscos em termos de contaminação do coronavírus e outros microrganismos são em terminais de ônibus, ambientes hospitalares com foco em maçanetas, interruptores ou catracas. Por isso, os demais ambientes (P1, P2, P3, P4 e P6) também merecem destaque, possuindo um número que está aproximadamente entre 50 e 200 unidades formadoras de colônias, indicando que a contaminação bacteriana é alta o suficiente para representar uma ameaça, destacando, assim a necessidade de melhores práticas de controle de infecção utilizando provavelmente descontaminantes mais efetivos.

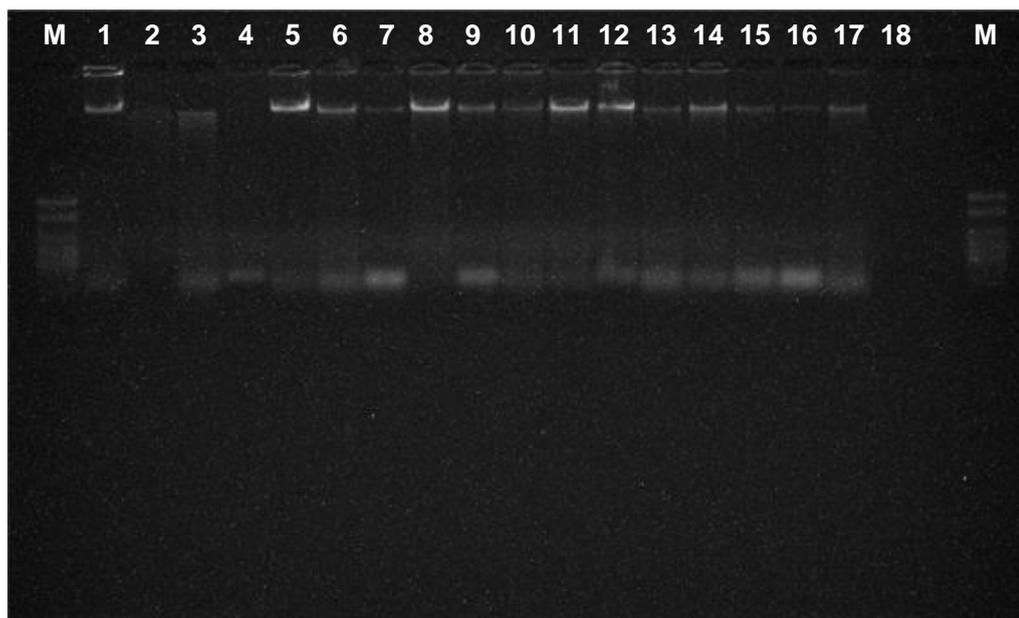
Extração do DNA Metagenômico (DNAm)

A fim de monitorar o ambiente estudado e prevenir infecções bacterianas, um repertório de técnicas laboratoriais é realizado. Sendo uma delas o isolamento do DNA genômico, incluindo ruptura celular, extração e recuperação de DNA. A lise das células bacterianas é uma etapa crítica neste processo que ocorre com o auxílio do reagente CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio (CLARK *et al.*, 2013). O clorofórmio e álcool isoamílico são utilizados, pois melhoram a detecção de comunidades bacterianas por meio de lise eficiente de microrganismos e uma melhor qualidade do DNA extraído (PÉREZ-BROCAL *et al.*, 2020). Esse protocolo de extração utilizando após

enriquecimento das amostras com meio de cultivo demonstrou eficiência em obter o DNA para as posteriores análises.

A extração do material genético das amostras representa a etapa essencial na obtenção de DNA de boa qualidade e na garantia da identificação precisa da composição microbiana. Portanto, é imprescindível avaliar as metodologias disponíveis para esse processo, otimizando os protocolos e procedimentos que proporcionem quantidade, pureza e integridade suficientes do DNA, obtendo assim amostras de alta qualidade, como mostra a maioria das extrações na figura 1.

Figura 1: Extração de DNA metagenômico dos ambientes avaliados. Extremidades marcador de peso Molecular DNA Ladder 100pb (M). Amostras de 1 a 3 Posto da urgência (maçaneta, armário e mesa de recepção); 4 a 6 banheiro da maternidade (pia, barra de segurar e sanitário); 7 a 9 pediatria (armário, pia e prateleira); 10 a 12 laboratório (maçaneta, equipamento e bancada); 13 a 15 obstetrícia (berço, maca e equipamento); 16 a 18 sala de urgência (armário, bancada e maca).



Fonte: Aatoria Própria.

A purificação do DNA depende da amostra e do número de células contidas, fatores como: condições de transporte, armazenamento e idade das bactérias podem influenciar na qualidade da extração. Isto é, o rendimento e viabilidade do DNA das amostras diminuem em decorrência de armazenamento prolongado em freezer ou geladeiras, podendo ser um dos motivos de algumas bandas não aparecerem com tanta evidência. Por essa razão, a extração foi baseada na metagenômica de cada local, tendo em vista que o número de células contidas em uma população microbiana é maior do que em um isolado bacteriano. Contudo, é etapa subsequente do projeto a realização de novos testes mais promissores para análise dos isolados obtidos nos procedimentos citados. O que demanda tempo, dinheiro e um trabalho monumental impossibilitado atualmente pelas restrições da pandemia COVID-19, bem como pela

dificuldade em realizar sequenciamentos de nova geração para obtenção desses dados. Infelizmente esse tipo de projeto será pausado pelo nosso grupo de pesquisa devido a esses transtornos e pelo atual preço e disponibilidade desses sequenciamentos de nova geração. Apesar disso, outras possibilidades estão sendo exploradas para aquisição de informações pertinentes sobre as comunidades microbianas hospitalares. Não é interesse do grupo cessar completamente as análises, nem trabalhos dessa natureza, mas apenas modificá-las temporariamente para aguardar melhores condições de trabalho e que sejam menos arriscadas.

Reações de PCR

A remoção de contaminantes é um fator chave importante para uma PCR bem-sucedida, posto que a qualidade e a integridade do DNA afetarão diretamente os resultados de todos os procedimentos subsequentes. Apesar dos rastros observados abaixo das amostras de DNA extraídas elas expressaram prosperidade frente as ampliações dos genes 16S rRNA. Esses rastros podem ser provenientes de substâncias aromáticas dificilmente separadas no protocolo de extração do DNA por CTAB. Isto é um parâmetro importante para perceber se o interesse futuro for sequenciar os amplicons apresentados. O sequenciamento do gene ribossômico 16S (rRNA) possui normalmente alto rendimento e tem o potencial de fornecer caracterização detalhada de comunidades microbianas de uma variedade de nichos ecológicos em humanos (CLAASSEN-WEITZ *et al.*, 2020). No planeta pós-pandemia esta é uma possibilidade real para aquisição de informações preciosas a respeito da estrutura populacional dessas bactérias analisadas.

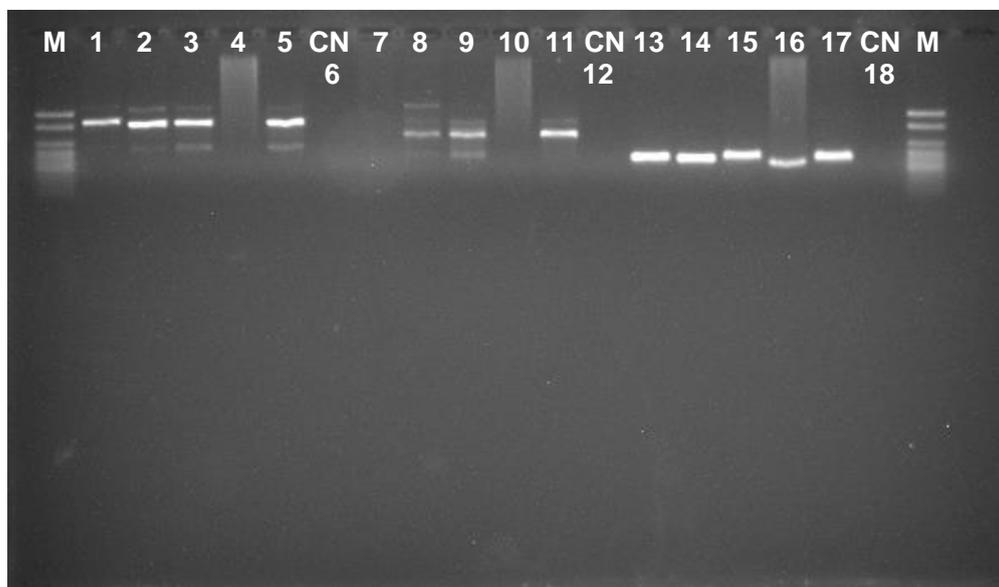
Para as reações com o gene 16S rRNA foram utilizados conjuntos de primers específicos. Os genes foram amplificados concomitantemente com os primers desenvolvidos e com os primers já descritos na literatura para o 16S rRNA. Os primers desenvolvidos pelo grupo de pesquisa foram denominados de ISBAf e ISBAr. Estes foram elaborados utilizando milhares de sequências disponíveis nos bancos de dados do NCBI e do RDP-II. Na figura 2 é possível observar a clareza na distribuição dos amplicons, tendo em vista que esse dado permitirá análises futuras para o sequenciamento nucleotídico das populações microbianas coletadas.

Todos os microrganismos têm pelo menos uma cópia do 16S, tornando-o onipresente e, como é altamente conservado e evolui lentamente, é o alvo único mais amplamente utilizado para estudos filogenéticos de bactérias e arqueias. Este gene possui aproximadamente 1600 pares de bases de comprimento e inclui nove regiões hipervariáveis de conservação (V1-V9). Regiões mais conservadoras são úteis para determinar os táxons de classificação mais alta, enquanto aquelas de evolução mais rápida podem ajudar a identificar gêneros ou espécies (BUKIN *et al.*, 2019).

Church e colaboradores (2020) salientaram que primers com construções semelhantes ao ISBA geralmente têm como alvo os primeiros 500 pb do gene da

subunidade ribossômica pequena, pois a análise das regiões V1-V3 é considerada suficiente para permitir a identificação precisa da maioria dos gêneros e espécies. Portanto, a maioria das sequências 16S atualmente depositadas em bancos de dados públicos correspondem a essa parte do gene. Sendo assim, a metodologia empregada para a construção dos primers bem como para sua aplicação, seja para sequenciamento direto ou para construção de bibliotecas genômicas, se mostrou efetiva podendo contribuir substancialmente para o isolamento e análise global das populações microbianas.

Figura 2: Amplificação de DNA metagenômico utilizando os primers RAPD e 16S. Extremidades marcador de peso Molecular DNA Ladder 100pb (M). 1 a 5 RAPD - H09; CN6 (Controle Negativo) Mix RAPD H-09; 7 a 11 RAPD – N15; CN12 (Controle Negativo) Mix RAPD N15; 13 a 17 16S rRNA; CN18 (Controle Negativo) Mix 16S rRNA.



Fonte: Autoria Própria.

A figura demonstra a amplificação de 5 amostras escolhidas aleatoriamente entre as 18 existentes e a plenitude da eficiência dos primers utilizados, tendo em vista que são vistas bandas diversas nos primers de RAPD e as bandas claras e fortes analisadas em gel de agarose corroboram com a qualidade da amplificação do gene 16S. As amostras referentes aos pontos de coleta revelam, em sua maioria, uma boa viabilidade. Tais resultados implicam em um futuro sequenciamento nucleotídico próspero.

Contudo, devido as dificuldades impostas pela pandemia global de COVID-19 as tentativas de sequenciamento genético dos produtos gênicos da PCR do gene 16S das bactérias isoladas e do DNA metagenômico foram frustradas. Sendo assim, estratégias adicionais foram empregadas na tentativa de suprir essa demanda do projeto. Onde para isso foram realizadas análises dos perfis de RAPD dos isolados bacterianos e os resultados se mostraram bastante promissores, ensejando inclusive a possibilidade de projetos futuros envolvendo essa técnica que utiliza pequenas quantidades de amostra

de DNA sem envolver marcadores radioativos e são mais simples e rápidas na identificação de várias espécies de plantas, bactérias e microrganismos conforme visto seu teste na figura 2.

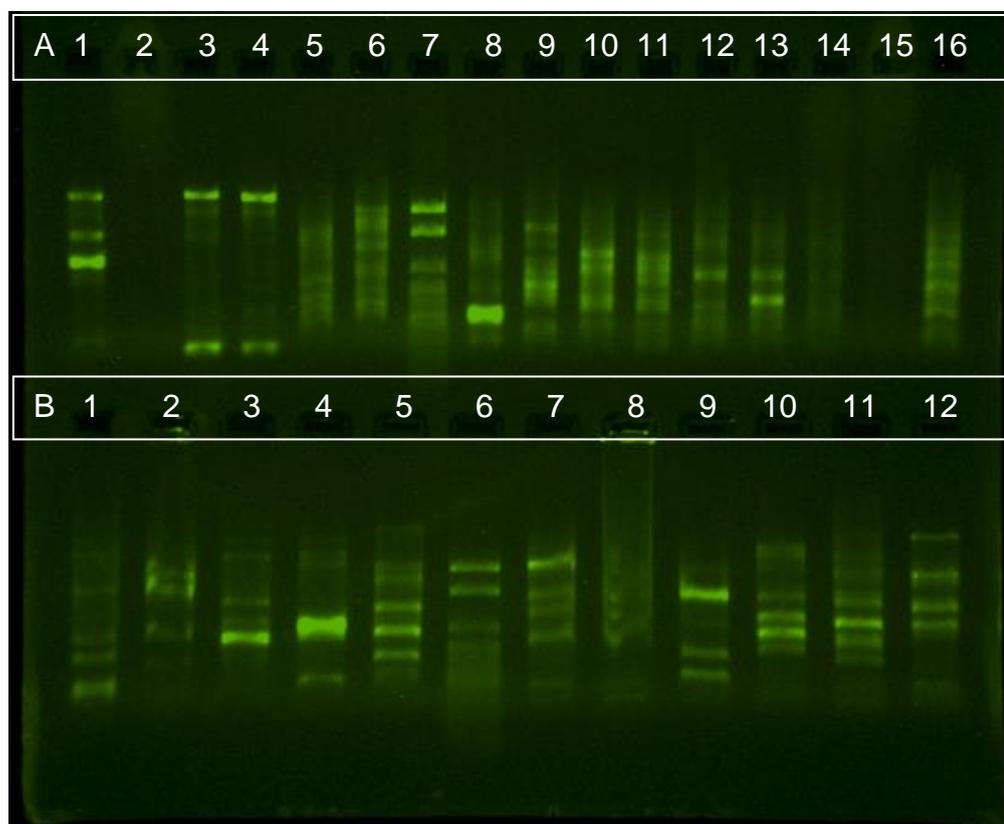
O RAPD (Polimorfismos no DNA Amplificados Aleatoriamente) é uma das técnicas empregadas na identificação de diferentes organismos seja para caracterização ou para estudos prévios. Apesar de ser um marcador molecular dominante, ou seja, não distinguir heterozigotos de homozigotos (MEDRAOUI *et al.*, 2007), dependendo do objetivo que se pretende alcançar, muitas informações importantes podem ser obtidas para selecionar material genético de interesse (SANTOS *et al.*, 2010).

É uma tendência no uso de primers RAPD que eles sejam curtos e que tenham temperaturas de melting baixas para favorecer a amplificação aleatória das sequências inespecíficas randômicas em reações de PCR nos organismos estudados. Contudo, melhorias nos parâmetros de reação podem tornar os primers mais seletivos e com uma maior reprodutibilidade experimental, neste caso foi utilizada uma temperatura de 50°C para o anelamento dos primers e um tempo curto de 30s. Isto favorece a reprodutibilidade do experimento e diminui os produtos inespecíficos da reação aumentando a confiabilidade do experimento e permitindo a obtenção de padrões de bandeamento mais eficientes, contáveis e analisáveis com maior facilidade. São, no momento, pretensões futuras do grupo de pesquisa a continuidade dessas análises para obtenção de procedimentos experimentais que permitam a identificação bacteriana sem a necessidade de cultivo ou de sequenciamento gênico utilizando apenas a técnica de RAPD.

Na figura 3 a seguir é possível perceber a semelhança genética entre certas bactérias e a diferença genética entre outras, permitindo inferir que certos isolados são na verdade bactérias idênticas geneticamente e outros isolados são realmente organismos únicos que fazem parte da coleção de microrganismos do trabalho. Dessa forma, possibilitando a compreensão de que há padrões com caráter monomórficos e polimórficos nas amostras.

Foram utilizados dois primers RAPD para a construção desses perfis são eles o H09 e o N15 descritos por Santos *et al.*, 2010. Esses primers foram desenvolvidos para analisar inicialmente acessos de cultivares de sorgo, mas os resultados se mostraram efetivos em bactérias gerando perfis reproduzíveis, como também diferenciados para microrganismos iguais ou diferentes respectivamente. Visualmente é notória a diferença observada entre a maior parte das linhagens bacterianas analisadas, contudo só um estudo aprofundado poderá definir claramente o que foi observado nestes testes e que futuramente serão objetivos de novos trabalhos do grupo de pesquisa.

Figura 3: Amplificações RAPD com linhagens aleatórias utilizando os primers H09 e N15 em isolados provenientes de ambiente hospitalar na cidade de Cuité-PB. Linha A utilizando o Primer H09 e Linha B com o N15.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com os primers, percebeu-se que o número de bandas amplificadas variou, uma vez padronizadas em bandas de alta intensidade e outras tênues ou menos intensas. A variação na intensidade das bandas pode ser relatada pelas diferenças no número de cópias amplificadas do fragmento, causadas pela competição entre produtos no processo de PCR. Enquanto as bandas consideradas comuns são comparadas como presentes ou ausentes e convertidas em dados (1 ou 0, respectivamente), sendo utilizados na análise de comparação entre os genótipos (BINNECK *et al.*, 2002). Para isso, análises futuras de matrizes binárias com coeficientes de similaridade podem ser empregadas para que esses perfis possam ser comparados e que seus padrões para determinadas espécies sejam definidos, favorecendo identificações futuras mais rápidas e diversos desdobramentos para os novos projetos do grupo de pesquisa.

Triagem da atividade antibacteriana da Ampicilina

Segundo a ANVISA a ampicilina quando em associação com sulbactam é ativa contra cepas produtoras de beta-lactamases incluindo *S. aureus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Klebsiella spp.* e anaeróbios. Por outro lado, não possui atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* ou cepas de *enterobacteriaceas* indutoras de beta-lactamases. Já existem relatos de cepas de *E.*

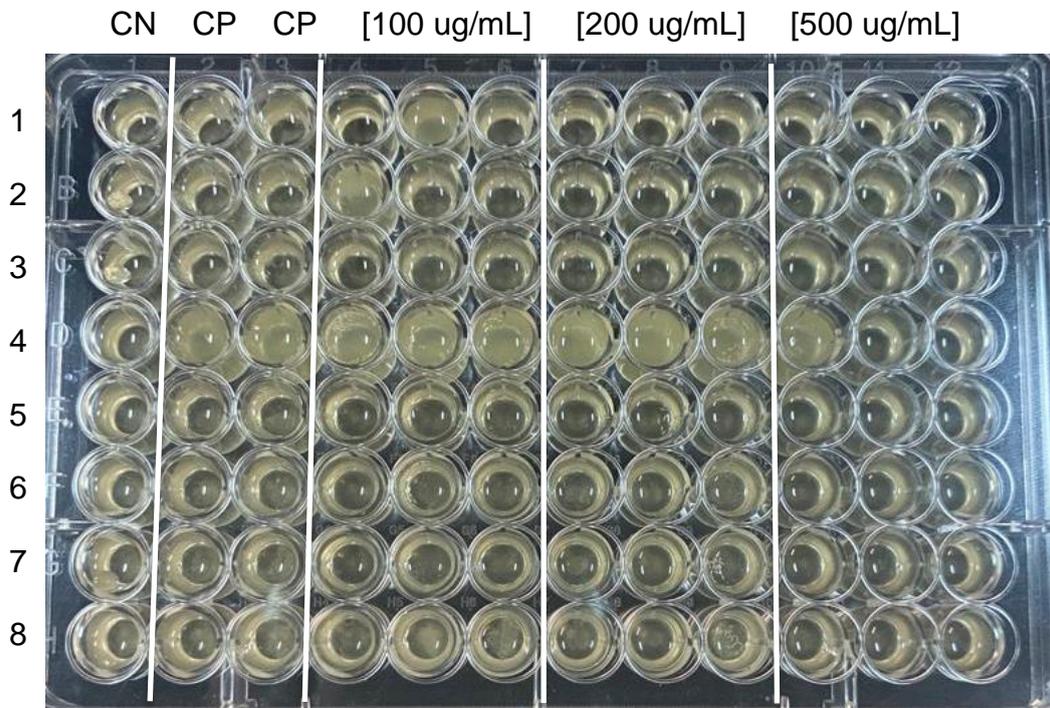
coli resistentes a esta associação. Um estudo análogo, relatou que o aumento da resistência antimicrobiana à ampicilina/sulbactam entre *E. coli* e outras *Enterobacteriaceae* incluindo isolados adquiridos na comunidade, durante a última década, comprometeu a utilidade clínica desses agentes para terapia empírica de infecções Gram-negativas graves. Isso provavelmente se deve ao uso excessivo dessas drogas em crianças e adultos.

Assim como as associações com sulbactam são realizadas no intuito de melhorar a eficácia da Ampicilina estudos denotam que os cientistas estão tentando aumentar a atividade de antibióticos menos ativos de tal forma que sejam conjugados a nanopartículas e consigam o êxito da atividade antimicrobiana contra microrganismos multirresistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* sensível à metilicina e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina. Por conseguinte, a ampicilina conjugada foi ativa contra todas as bactérias testadas (MUREI *et al.*, 2020).

Um estudo publicado na revista Science em 2016, trouxe demonstrações em larga escala de como uma bactéria reage a doses crescentes de antibióticos, a cada nível de concentração da droga, um pequeno segmento das bactérias se adaptava às condições adversas, resultado de sucessivas mudanças genéticas (BAYM, 2016). De outro modo, qualquer organismo pode sofrer alterações genéticas e dar saltos evolutivos rápidos capazes de infectar outras espécies ou de se tornarem resistentes aos tratamentos conhecidos. Tal fato é semelhante com a amostra da pia do banheiro, uma vez que ao se adaptar aquela determinada concentração, sendo ela mais alta ou não, a bactéria ainda consegue se proliferar e prosseguir com sua patogenicidade, como mostra na figura 4 a seguir.

É notório que nem todos os poços presentes na microplaca expressaram turbidez acentuada, isto não quer dizer que inexistam bactérias ou que elas não possam se proliferar ou até mesmo mutar e se adaptar ao meio. Este experimento foi realizado por 3 dias. No estudo da Science alguns experimentos duraram mais de 30 dias e ainda sim mostraram adaptação e crescimento bacteriano. Percebe-se que as amostras 4, que apresentou maior crescimento, referente a pia do banheiro da maternidade atestaram resistência à essa droga em altas concentrações. Isso mostra o quanto as terapias farmacológicas diminuem ao longo do tempo, ao mesmo passo que as bactérias se tornam cada vez uma ameaça para a sociedade. Além disso, as amostras 6, 7 e 8 também demonstraram visualmente uma tendência na queda do crescimento na medida que a concentração de antibiótico aumenta. Vários insights podem ser tirados sobre este teste enseando a possibilidade de trabalhos futuros que utilizem esses testes rápidos para controle da qualidade de limpeza e desinfecção hospitalar, independentemente do isolamento e identificação das bactérias presentes.

Figura 4: Triagem da atividade antibacteriana da Ampicilina. Linha vertical: Amostras de 1 a 3 Posto da urgência (maçaneta, armário e mesa de recepção); 4 a 6 banheiro da maternidade (pia, barra de segurar e sanitário); 7 e 8 pediatria (armário e pia). Linha horizontal: Controle Negativo (CN); Controle Positivo (CP); e concentrações de 100ug/mL, 200ug/mL e 500ug/mL.



Fonte: A autoria própria.

Hospitais e superfícies são reservatórios negligenciados para uma série de microrganismos que podem impactar diretamente a saúde humana por meio de contaminações ou infecções. Assim, a análise microbiana de determinados locais auxilia na descoberta de novos métodos de controle e prevenção desses microrganismos, a pia do banheiro, retratada pela amostra 4, designa uma superfície aparentemente limpa, mas que pode estar ocasionando maiores problemas para os enfermos, posto que bactérias e vírus não são observáveis a olho nu. Neste cenário, as inspeções devem dispor de metodologias mais seguras e eficazes, ainda mais em tempos de coronavírus, onde requer maior prudência e dedicação aos pacientes.

Por essa razão, o grupo de pesquisa aprovou uma nova vigência com temática semelhante, abordando identificação microbiana em ambientes públicos, incluindo as amostras do hospital de Cuité. Além disso, será realizado testes com antimicrobianos bem como substâncias que possui esse potencial, a título de exemplo está o óleo de copaíba. Como dito anteriormente o grupo de pesquisa está comprometido com este tipo de trabalho, no entanto o estado de pandemia atual requer maior cautela e cuidado na elaboração e desenvolvimento de pesquisas dessa natureza. Independentemente desses novos desafios o grupo ainda realizará testes adicionais sobre esta temática.

CONCLUSÃO

Apesar de ser um trabalho prospectivo, em síntese, embora a pesquisa tenha sido desafiadora, foi possível analisar satisfatoriamente o ambiente pretendido. Dado o exposto, conclui-se que os resultados encontrados neste estudo refletem um nível alto de contaminação, levando em consideração que as superfícies, equipamentos, macas, salas de urgência, laboratório, leitos e outras áreas do Hospital estavam altamente infectadas, como exibe os resultados supracitados. Bactérias são potencialmente patogênicas à saúde dos pacientes, sendo estas resistentes aos meios contendo ampicilina, antibiótico de amplo espectro comumente utilizado em infecções antibacterianas. Diante das observações da disseminação de patógenos no ambiente hospitalar, faz-se necessário maior entendimento, controle das fontes e disponibilização de recursos, considerando que o conhecimento destes microrganismos é relevante para otimizar o tratamento da infecção e estabelecer medidas preventivas. É importante que o trabalho não pare e que análises futuras sejam realizadas como parâmetros comparativos dos resultados atuais e que testes adicionais sejam realizados para esclarecer melhor o comportamento dessas comunidades microbianas no referido ambiente.

Todavia, a presença de microrganismos em ambientes seja ele qual for não é um fato surpreendente, é uma realidade. Mas, ainda importuna os órgãos de saúde mundiais, este não é um problema Cuiteense e sim global, uma vez que uma porcentagem significativa de vírus e bactérias podem ser biomonitorados com inspeções frequentes e/ou investimentos em estudos moleculares para identificação microbiana naquela determinada população e assim, buscar métodos eficientes e específicos para este fim, auxiliando no domínio das bactérias e posteriormente das infecções nosocomiais. As técnicas demonstraram eficácia e qualidade para um futuro sequenciamento e apesar de todas as particularidades que os métodos dependentes e independentes de cultura baseados na microbiologia molecular, possuam, elas permitem a compreensão de microbiomas de hospitais e outros ambientes mesmo que de modo global e superficial. Dessas análises vários outros desdobramentos podem ser pensados e assumidos para melhoria da qualidade dos atendimentos hospitalares não só em Cuité, mas no Brasil. A análise direta da amostra, o sequenciamento de DNA de amplicon ou metagenômica e as técnicas de bioinformática estão revolucionando a análise microbiológica em ambientes hospitalares, além de serem rápidas e sensíveis.

Não é objetivo do trabalho, mas nessa conjuntura também se faz importante a preocupação com a automedicação de antibióticos pela sociedade, sendo nítida a presença de microrganismos resistentes, principalmente em unidades de saúde. A maioria das pessoas praticam automedicação e trazem prejuízos a sua saúde devido à falta de informação. Em contrapartida, atualmente os centros desenvolvidos de saúde são repletos de profissionais que levam conhecimento à população acautelando futuros problemas relacionados a medicamentos e resistência antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boletim Informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. São Paulo, 2015. Disponível em: < file:///C:/Users/hilte/Downloads/Boletim **Qualidade e Segurança do Paciente Resistência Microbiana**. Acesso em 09 set. 2021.

ASMARAWATI, Tri Pudy *et al.* The clinical impact of bacterial co-infection among moderate, severe and critically ill COVID-19 patients in the second referral hospital in Surabaya. **F1000Research**, v. 10, n. 113, p. 113, 2021.

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

BEHERA, Himanshu Sekhar *et al.* Identification of population of bacteria from culture negative surgical site infection patients using molecular tool. **BMC surgery**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2021.

BINNECK, Eliseu; NEDEL, Jorge Luiz; DELLAGOSTIN, Odir A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil?. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p. 183-196, 2002.

BOADA, A.; Pons-Viqués, M.; Real, J.; Grezner, E.; Bolibar, B.; Llor, C. Previous antibiotic exposure and antibiotic resistance of commensal *Staphylococcus aureus* in Spanish primary care. **European Journal of General Practice**, v.24, n.1, p.125-130, 2018.

BUKIN, Yu S., Yu P. Galachyants, I. V. Morozov, S. V. Bukin, A. S. Zakharenko, and T. I. Zemskaya. "The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results." **Scientific Data** 6, no. 1 (2019): 1-14.

CHURCH, Deirdre L., Lorenzo Cerutti, Antoine Gürtler, Thomas Griener, Adrian Zelazny, and Stefan Emler. "Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory." **Clinical Microbiology Reviews** 33, no. 4 (2020): e00053-19.

CLAASSEN-WEITZ, Shantelle *et al.* Optimizing SS rRNA gene profile analysis from low biomass nasopharyngeal and induced sputum specimens. **BMC microbiology**, v. 20, p. 1-26, 2020.

CLARK, Andrew E. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

FU, Junjiang *et al.* Genetic characterization and authentication of *Lonicera aponica* Thunb. by using improved RAPD analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 10, p. 5993-5999, 2013.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Infecções hospitalares**, 2010. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=926&sid=32>. Acesso em: 18/09/2021.

KOCH, Anne Mette *et al.* Mortality related to hospital-associated infections in a tertiary hospital; repeated cross-sectional studies between 2004-2011. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2015.

LAGIER, Jean-Christophe, Perrine Hugon, Saber Khelaifia, Pierre-Edouard Fournier, Bernard La Scola, and Didier Raoult. "The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota." **Clinical microbiology reviews** **28**, 2015.

LAX, Simon, Naseer Sangwan, Daniel Smith, Peter Larsen, Kim M. Handley, Miles Richardson, Kristina Guyton *et al.* "Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital." **Science translational medicine** **9**, no. 391 (2017).

LÉPESOVÁ, Kristína *et al.* Hospital Wastewater—Important Source of Multidrug Resistant Coliform Bacteria with ESBL-Production. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 21, p. 7827, 2020.

MEDRAOUI, L.; Ater, M.; Benhabib, O.; Msikine, D.; Filali-Maltouf, A. Evaluation of genetic variability of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) in northwestern Morocco by ISSR and RAPD markers. **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, n.11, p.789–797, 2007.

MUHAMAD RIZAL, Nurnabila Syafiqah, Hui-min Neoh, Ramliza Ramli, Alfizah Hanafiah, Muttaqillah Najihan Abdul Samat, Toh Leong Tan, Kon Ken Wong *et al.* "Advantages and limitations of 16S rRNA next-generation sequencing for pathogen identification in the diagnostic microbiology laboratory: perspectives from a middle-income country." **Diagnostics** **10**, 2020.

MUREI, Arinao *et al.* "Functionalization and antimicrobial evaluation of ampicillin, penicillin and vancomycin with *Pyrenacantha grandiflora* Baill and silver nanoparticles." **Scientific reports** vol. 10,1 11596. 14 Jul. 2020, doi:10.1038/s41598-020-68290-x.

ODOYO, Erick *et al.* "Ten Thousand-Fold Higher than Acceptable Bacterial Loads Detected in Kenyan Hospital Environments: Targeted Approaches to Reduce Contamination Levels." **International journal of environmental research and public health** vol. 18,13 6810. 25 Jun. 2021.

OLIVEIRA, Adriana Cristina de; DAMASCENO, Quésia Souza. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 44, p. 1118-1123, 2010.

PÉREZ-BROCAL, Vicente *et al.* "Optimized DNA extraction and purification method for characterization of bacterial and fungal communities in lung tissue samples." **Scientific reports** vol. 10,1 17377. 15 Oct. 2020, doi:10.1038/s41598-020-74137-2

PÉREZ-ETAYO, Lara *et al.* Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Different Aquatic Environments in the North of Spain and South of France. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1425, 2020.

SAADI, Somia *et al.* Bacterial contamination of neglected hospital surfaces and equipment in an Algerian hospital: an important source of potential infection. **International Journal of Environmental Health Research**, p. 1-9, 2021.

SANTOS, Igor LVL *et al.* Utilização de RAPD na caracterização molecular de acessos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) recomendados para o semi-árido de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 1, p. 60-66, 2010.

SZE, Marc A.; SCHLOSS, Patrick D. The impact of DNA polymerase and number of rounds of amplification in PCR on 16S rRNA gene sequence data. **Msphere**, v. 4, n. 3, p. e00163-19, 2019.

TUMUHAMYE, Josephine *et al.* Vaginal colonization with antimicrobial-resistant bacteria among women in labor in central Uganda: prevalence and associated factors. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2021.

WHO, World Health Organization. **Health care-associated infections Fact Sheet**. 2014.

Disponível: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>
Acesso em: 21. Mai. 2021.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADEMICA DE BIOLOGIA E QUIMICA - CES
Sítio Olho D'água da Bica, - Bairro Zona Rural, Cuité/PB, CEP 58175-000
Telefone: (83) 3372-1900
Site: <http://ces.ufcg.edu.br>

DECLARAÇÃO DE REVISÃO

Declaro para fins de comprovação, que o trabalho final do(a) aluno(a) Amanda Geovana Pereira de Araújo, intitulado: **IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS EM AMBIENTE HOSPITALAR NO MUNICÍPIO DE CUITÉ-PB.**, foi por mim revisado sob o aspecto técnico. Sob o aspecto linguístico (Português e Inglês), a revisão foi feita pelo(a) professor(a) Igor Luiz Vieira de Lima Santos.



Documento assinado eletronicamente por **IGOR LUIZ VIEIRA DE LIMA SANTOS, PROFESSOR 3 GRAU**, em 29/09/2021, às 22:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1809123** e o código CRC **1F36B147**.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADEMICA DE BIOLOGIA E QUIMICA - CES
Sítio Olho D'água da Bica, - Bairro Zona Rural, Cuité/PB, CEP 58175-000
Telefone: (83) 3372-1900
Site: <http://ces.ufcg.edu.br>

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DO(A) ALUNO(A) A SER PREENCHIDA PELO ORIENTADOR

Título do Projeto:	IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS EM AMBIENTE HOSPITALAR NO MUNICÍPIO DE CUITÉ-PB.
Programa:	PIBIC
Orientador(a):	Igor Luiz Vieira de Lima Santos
Aluno(a):	Amanda Geovana Pereira de Araújo
Centro:	CES
Unidade Acadêmica:	UABQ
Área:	Genética

1. A apreciação suscita do orientador(a) sobre o(a) aluno(a) (Iniciativa, Responsabilidade, Assiduidade e Criatividade):

A aluna cumpriu com todas as suas obrigações para com o programa de iniciação científica realizando todas as suas atividades.

2. Atividades do aluno(a):

Laboratorial, Pesquisa, Escrita e todas as obrigações do programa de iniciação.

3. Andamento do Projeto, de acordo com o cronograma proposto no Plano de Trabalho do(a) Aluno(a):

O projeto foi desenvolvido suficientemente apesar dos desafios impostos pela pandemia, alguns atrasos foram percebidos e dificuldades na obtenção de alguns resultados, mas de modo geral os objetivos foram alcançados.

4. Justificativa (no caso do não cumprimento ao Cronograma):



Documento assinado eletronicamente por **IGOR LUIZ VIEIRA DE LIMA SANTOS, PROFESSOR 3 GRAU**, em 29/09/2021, às 22:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1809125** e o código CRC **FE480E4B**.

Referência: Processo nº 23096.060222/2021-06

SEI nº 1809125