



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Thaís Alves Barbosa

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACILOS GRAM-
NEGATIVOS ISOLADOS EM UNIDADE DE TERAPIA
INTENSIVA NEONATAL E DETECÇÃO FENOTÍPICA E
MOLECULAR DE ESBL E CARBAPENEMASES.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Associada Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu

2020

Thaís Alves Barbosa

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACIOS
GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA NEONATAL E DETECÇÃO
FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ESBL E
CARBAPENEMASES.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Associada Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Barbosa, Thais Alves.

Caracterização molecular de bacilos Gram-negativos isolados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e detecção fenotípica e molecular de ESBL e carbapenemases / Thais Alves Barbosa. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Capes: 21201021

1. Bactérias gram-negativas. 2. Tratamento intensivo neonatal. 3. Infecções bacterianas gram-negativas.
4. beta-Lactamases.

Palavras-chave: β -lactamases de espectro estendido; AmpC; Carbapenemases; Colonização; Infecção.

Thaís Alves Barbosa

Caracterização molecular de bacilos Gram-negativos isolados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e detecção fenotípica e molecular de ESBL e carbapenemases.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doença Tropicais.

Orientadora: Profa. Associada Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Comissão examinadora:

Prof. Dr. João César Lyra
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante
Faculdade de Medicina de Botucatu

Dra Lígia Maria Abraão
Serviço de Controle de Infecção da Regional São Paulo

Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari
Universidade Federal de São Paulo

Botucatu, ____ de _____ de _____.

Dedicatória

*“A Deus,
por estar presente em todos os momentos da minha vida.”*

Agradecimentos

*Sou grata a **Deus** pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, sem Ele nada sou. Agradeço por ter plantado em mim um sonho, que hoje se realiza, pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas e lugares interessantes, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado.*

*É imensa a gratidão que tenho pelos meus pais, **Rosilene** e **Cláudio**, instrumentos necessários para concretizar o precioso dom que recebi do universo: “a vida”. Vocês são e serão responsáveis por cada sucesso alcançado e cada passo avançado pelo resto da minha vida.*

*À minha irmã **Isabela**, pelo entusiasmo, gestos de amor e carinho, por estar sempre ao meu lado.*

*Às minhas irmãs de coração, **Isabela Carla** e **Maristela**, por alegrarem a minha vida e sempre vibrarem pelas minhas conquistas.*

*Ao meu namorado **Neylor**, por ter vivenciado comigo passo a passo todos os detalhes deste trabalho, ter me ajudado durante sua construção, por ter me dado todo o apoio que necessitava nos momentos difíceis, todo carinho, respeito, compreensão, por ter me aturado nos momentos de estresse e por tornar minha vida cada dia mais feliz.*

*À minha orientadora, **Prof.^a Associada Maria de Lourdes R. S. Cunha**, por todo apoio, amizade, companheirismo e dedicação. Obrigada por contribuir com tantos ensinamentos, tantas palavras de força e ajuda e, principalmente, por todas as vezes que me tratou como filha. Minha eterna gratidão e admiração!*

*À **Dra. Maria Regina Bentlin**, ao **Dr. João César Lyra** e a todos os funcionários da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal por terem permitido a execução deste trabalho e contribuído grandemente para a realização desta conquista.*

*À **Dra. Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo** por sempre demonstrar muito interesse na realização deste trabalho e deixar seus afazeres para nos acompanhar na finalização.*

Ao Prof. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza por estar sempre disposto em nos ajudar e tornar a minha trajetória no Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais muito mais leve.

Serei eternamente grata as pessoas que passaram pelo meu caminho durante a minha trajetória no Laboratório de Bacteriologia: Adilson, Ayrir, Caroline, Danilo, Eliane, Katheryne, Luíza, Mariana, Priscila, Wivian, Felipe, Lucas, Elka, Letícia, Nayara, Milena, por toda ajuda, pelos ensinamentos e momentos divididos juntos; Lígia, Camila, Ana e Nathália, aos quais aprendi a amar e construir laços eternos. Em vocês encontrei verdadeiros irmãos. Obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês. Carrego vocês comigo aonde quer que eu vá.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial, Larissa, Ivana, Rafael, Luiz Alquati, Luiz Severino e Silvia por toda colaboração, carinho e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro referente à bolsa de Doutorado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada!!

Epígrafe

“Em meio à dificuldade, encontra-se a oportunidade”

Albert Einstein

RESUMO

A elevação das taxas de bactérias multirresistentes em ambientes destinados a prestação de cuidados à saúde é reconhecido como um problema de saúde pública mundial. Atualmente, as opções terapêuticas são limitadas em decorrência da produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), β -lactamases do tipo AmpC e carbapenemases. Tais enzimas são capazes de se disseminar com facilidade entre patógenos, dificultando o controle e o tratamento das infecções nosocomiais. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo principal estudar micro-organismos Gram-negativos isoladas de aspirado traqueal (AT) e da mucosa nasal (MN) e anal (MA) de neonatos da UTIN pertencentes ao Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Os micro-organismos foram coletados previamente em um estudo de coorte prospectivo no período de novembro de 2013 a novembro de 2014, visando determinar a resistência aos antimicrobianos, fatores de virulência e pesquisa de clones prevalentes na Unidade. As enterobactérias e os bacilos gram-negativos não fermentadores (BGNF) previamente coletados foram submetidos à identificação genotípica, detecção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), β -lactamases do tipo AmpC e carbapenemases, produção de biofilme e detecção de marcadores de virulência específicos em *Pseudomonas aeruginosa*. Para a pesquisa de clones prevalentes na unidade, foi realizada a tipagem pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os resultados revelaram que as enterobactérias foram os micro-organismos predominantes em sítios de colonização e infecção. Este trabalho demonstrou maior colonização da MA seguida pela MN. *Enterobacter cloacae* foi a espécie isolada com maior frequência em amostras de colonização. Os dados aqui encontrados revelaram maiores índices de infecção por *Klebsiella* spp. e *Serratia marcescens*, causando infecção da corrente sanguínea e pneumonia, respectivamente. Nesta pesquisa, pôde ser observada elevada produção de biofilme, sendo que 95,0% das enterobactérias e 100% dos BGNF foram produtores, com maior proporção de enterobactérias mostrando média produção de biofilme, enquanto os BGNF demonstraram em sua maioria serem fortes produtores. Através da pesquisa dos genes codificadores de fatores de virulência específicos para *Pseudomonas aeruginosa* foi possível observar que a maioria dos isolados apresentaram genes codificadores de alginato, fosfolipase C hemolítica, exotoxina A e ramnolipídeos. A pesquisa fenotípica de ESBL revelou 16 (5,3%) dos isolados produtores dessas enzimas. Dentre esses, seis apresentaram genes de resistência, quatro (66,7%) apresentaram o gene codificador de CTX-M-9, três (50%) apresentaram o gene de TEM e um (16,7%) foi positivo para o gene de SHV e de CMY-2. A pesquisa de β -lactamases do Tipo AmpC revelou a produção fenotípica por 20

isolados e, destes, dois apresentaram o genótipo EBC. Através da análise do perfil genético, foi possível observar linhagens idênticas de espécies de enterobactérias em diferentes sítios de coleta de RNs distintos, evidenciando possível transmissão cruzada; além disso, foi possível identificar característica de persistência de algumas cepas dentro da unidade. Empregou-se uma análise uni e multivariada de regressão de Cox para verificar os fatores de risco de colonização e infecção por micro-organismos Gram-negativos. Os resultados da análise multivariada revelaram que, a cada semana a mais na idade gestacional, aumenta o risco diário em 7,0% para a colonização do RN por bacilos Gram-negativos, enquanto o uso de antimicrobianos nas primeiras 72 horas diminui o risco diário em 35% de colonização por esses patógenos. Além disso, a produção de biofilme por esses micro-organismos apresentou associação com a persistência da colonização do RN pelo mesmo patógeno e aumenta em 75% a chance diária do RN evoluir para infecção, assim como a produção de ESBL, que aumenta a chance diária em 46,8 vezes para o RN ter infecção. Os dados desta pesquisa são de fundamental importância para a saúde pública, pois permitem o conhecimento da epidemiologia molecular de espécies importantes de enterobactérias na UTIN de um hospital universitário terciário de alta complexidade, permitindo, assim, a intensificação do monitoramento e implantação de medidas de controle e precaução.

Palavras-chave: Colonização, infecção, β -lactamases de espectro estendido, AmpC e carbapenemases.

ABSTRACT

The increase rates of multidrug-resistant bacteria in healthcare environments are recognized as a worldwide public health problem. Currently, therapeutic options are limited due to the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL), AmpC-type β -lactamases and carbapenemases. Such enzymes can spread easily among pathogens, making it difficult to control and treat nosocomial infections. Therefore, the present study aimed to study Gram-negative microorganisms isolated from tracheal aspirate (TA) and nasal mucosa (MN) and anal (MA) from NICU newborns belonging to the Hospital das Clínicas (HC) of the Faculty of Medicine of Botucatu (FMB). Microorganisms were previously collected in a prospective cohort study from November 2013 to November 2014, in order to determine resistance to antimicrobials, virulence factors and clone research prevalent in the Unit. Previously collected enterobacteria and non-fermenting gram-negative bacilli (NFGNB) were subjected to genotypic identification, detection of extended spectrum β -lactamases (ESBL), AmpC-type β -lactamases and carbapenemases, biofilm production and detection of specific virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. For the research of clones prevalent in the unit, typing was performed using the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique. The results revealed that enterobacteria were the predominant microorganisms in colonization and infection sites. This work demonstrated greater colonization of MA followed by MN. *Enterobacter cloacae* was the most frequently isolated species in colonization samples. The data found here revealed higher rates of infection by *Klebsiella* spp. and *Serratia marcescens*, causing bloodstream infection and pneumonia, respectively. In this research, high biofilm production could be observed, with 95.0% of enterobacteria and 100% of NFGNBs being producers, with a higher proportion of enterobacteria showing average biofilm production, while NFGNBs were mostly strong producers. Through the search for genes encoding specific virulence factors for *Pseudomonas aeruginosa* it was possible to observe that most of the isolates had genes encoding alginate, hemolytic phospholipase C, exotoxin A and rhamnolipids. The ESBL phenotypic research revealed 16 (5.3%) of the isolates producing these enzymes. Among these, six had resistance genes, four (66.7%) had the CTX-M-9 coding gene, three (50%) had the TEM gene and one (16.7%) was positive for the gene of SHV and CMY-2. The search for AmpC-type β -lactamases revealed phenotypic production by 20 isolates and, of these, two presented the EBC genotype. Through the analysis of the genetic profile, it was possible to observe identical lineages of species of enterobacteria in different collection sites of different newborns, showing possible cross-transmission; in addition, it was possible to identify the persistence characteristic of some

strains within the unit. A univariate and multivariate analysis of Cox regression was used to verify the risk factors for colonization and infection by Gram-negative microorganisms. The results of the multivariate analysis revealed that, each week more at gestational age, the daily risk increases by 7.0% for the colonization of newborns by Gram-negative bacilli, while the use of antimicrobials in the first 72 hours decreases the daily risk in 35% of colonization by these pathogens. In addition, the production of biofilm by these microorganisms was associated with the persistence of colonization of the newborn by the same pathogen and increases by 75% the daily chance of the newborn evolving to infection, as well as the production of ESBL, which increases the daily chance 46.8 times for the newborn to have infection. The data of this research are of fundamental importance for public health, as they allow the knowledge of the molecular epidemiology of important species of enterobacteria in the NICU of a tertiary university hospital of high complexity, thus allowing the intensification of the monitoring and implementation of control measures and precaution.

Keywords: Colonization, infection, extended-spectrum β -lactamases, AmpC and carbapenemases

Lista de Quadros

Quadro 1 - Primers para identificação de enterobactérias e das espécies de bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados de neonatos da UTIN do HC da FMB.....	33
Quadro 2 - Iniciadores para amplificação dos genes relacionados à produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), β -lactamases AmpC e carbapenemases.....	37
Quadro 3 - Iniciadores para amplificação dos genes codificadores dos fatores de virulência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38

Lista de Figuras

Figura 1: Número de recém-nascidos colonizados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.....	41
Figura 2: Número de recém-nascidos infectados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.....	42
Figura 3: Frequência de genes codificadores de fatores de virulência específicos para <i>P. aeruginosa</i> encontrados em isolados na mucosa nasal (MN), anal (MA) e aspirado traqueal (AT) de neonatos da UTIN do HC da FMB.....	49
Figura 4: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> carregados por recém-nascidos.....	51
Figura 5: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Serratia marcescens</i> carregados por recém-nascidos.....	53
Figura 6: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Escherichia coli</i> carregados por recém-nascidos.....	54
Figura 7: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Klebsiella oxytoca</i> carregados por recém-nascidos.....	55
Figura 8: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carregados por Recém-nascidos.....	56
Figura 9: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Proteus mirabilis</i> carregados por recém-nascidos.....	56
Figura 10: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> carregados por recém-nascidos.....	57
Figura 11: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Citrobacter freundii</i> carregados por recém-nascidos.....	57

Figura 12: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>XbaI</i> de isolados de <i>Citrobacter diversus</i> carreados por recém-nascidos.....	58
Figura 13: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>SpeI</i> de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> carreados por recém-nascidos.....	58
Figura 14: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE- <i>Apal</i> de isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> carreados por recém-nascidos.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características dos neonatos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu incluídos no estudo.....	42
Tabela 2 - Enterobactérias isoladas da Mucosa Nasal, Mucosa Anal e Aspirado Traqueal de neonatos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	43
Tabela 3 - Bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados da Mucosa Nasal, Mucosa Anal e Aspirado Traqueal de neonatos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	44
Tabela 4 - Frequência de colonização por micro-organismos Gram-negativos isolados da mucosa anal, mucosa nasal e aspirado traqueal de recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.....	45
Tabela 5 - Tempo em dias de colonização de neonatos por patógenos Gram-negativos.....	45
Tabela 6 - Frequência de infecção por micro-organismos isolados de hemocultura, aspirado traqueal e cultura de urina de recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.....	46
Tabela 7 - Determinação de quanto tempo (em dias), posteriormente à colonização, pode ser constatado o desenvolvimento de infecção por micro-organismos Gram-negativos.....	46
Tabela 8 - Determinação da produção de biofilme em micro-organismos Gram-negativos isolados de recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.....	47
Tabela 9 - Genes de resistência observados em enterobactérias isoladas da mucosa nasal, anal e de hemocultura de recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.....	48
Tabela 10 - Análise Uni e Multivariada (Regressão de Cox) para preditores de colonização por Enterobactérias e Bacilos Gram-negativos não fermentadores em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	60
Tabela 11 - Análise uni e multivariada (Regressão de Cox) para preditores de colonização por Enterobactérias em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	61

Tabela 12 - Análise Uni e Multivariada (Regressão de Cox) para preditores de colonização por Bacilos Gram-negativos não fermentadores em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	62
Tabela 13 - Análise Uni e Multivariada (Regressão de Cox) para preditores de persistência da colonização por Bacilos Gram-negativos em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	63
Tabela 14 - Análise Uni e Multivariada (Regressão de Cox) para preditores de colonização por Enterobactérias e Bacilos Gram-negativos não fermentadores produtores de biofilme em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	64
Tabela 15 - Análise uni e multivariada (Regressão de Cox) para preditores de infecção por Enterobactérias e Bacilos Gram-negativos não fermentadores em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	65

Lista de abreviaturas

AFB: Ácido fenilborônico

AT: Aspirado traqueal

BGNF: Bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose

BHI: Infusão de Cérebro e Coração

ESBL: β -lactamases de espectro estendido

FMB: Faculdade de Medicina de Botucatu

HC: Hospital das Clínicas

ICS: Infecção da Corrente Sanguínea

IRAS: Infecções relacionadas à assistência à saúde

ITU: Infecção do trato urinário

MA: Mucosa anal

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*

MIC: Concentração Inibitória Mínima

MN: Mucosa nasal

PBP: Proteína ligadora de penicilina

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis

RN: Recém-nascido

TSB: Caldo Trypticase de soja

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

UTIN: Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 Local de estudo.....	27
3.2 Definições.....	27
3.3 Delineamento do estudo.....	29
3.4 Coleta dos dados clínicos.....	31
3.5 Coleta dos espécimes microbiológicos.....	31
3.6 Identificação genotípica dos patógenos.....	32
3.7 Produção de Biofilme.....	33
3.8 Confirmação da produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL).....	34
3.9 Determinação da produção de β - lactamases AmpC.....	34
3.10 Detecção de micro-organismos produtores de carbapenemases.....	35
3.11 Extração do DNA bacteriano.....	35
3.12 Caracterização molecular de amostras produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), produção de β -lactamases AmpC e Carbapenemases.....	36
3.13 Avaliação do perfil de virulência das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
3.14 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	38
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Amostras.....	41
5.2 Características da população estudada.	42
5.3 Identificação dos Micro-organismos.....	43
5.4 Determinação da colonização e infecção em recém-nascido.....	44
5.4.1 Colonização.....	44
5.4.2 Infecção.....	45
5.5 Produção de biofilme.....	46
5.6 Produção de β - lactamases de espectro estendido (ESBL)	47
5.7 Determinação da produção de β - lactamases AmpC.....	48

5.8 Produção de Carbapenemases.....	48
5.9 Perfil de virulência dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	49
5.10 Perfil clonal dos isolados – Pulsed Field Gel Electrophoresis.....	49
5.11 Análise dos Fatores de Risco.	59
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

A elevação das taxas de bactérias multirresistentes em ambientes destinados a prestação de cuidados à saúde é reconhecido como um problema de saúde pública mundial.¹ O conhecimento sobre a utilização de antimicrobianos em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) contribui para a definição de restrição antimicrobiana, variando de acordo com os padrões locais de resistência.^{2,3,4}

A colonização normal do neonato inicia-se logo após o rompimento das membranas amnióticas, prosseguindo através do contato com a mãe e com o ambiente até que seja estabelecida a microbiota do bebê. Diversos fatores podem influenciar no processo de colonização do Recém-nascido (RN), dentre eles, a microbiota materna, a alimentação do RN, as pessoas que estabelecem contato direto com a criança e o ambiente em que ela nasce e permanece, compreendendo objetos e microbiota de outros bebês que ocupam o mesmo espaço.⁵

Frequentemente, RNs que mantêm contato com a mãe e recebem aleitamento materno natural são colonizados posteriormente ao nascimento através da pele e superfícies mucosas, como nasofaringe, orofaringe, conjuntivas, genitália externa e cordão umbilical.⁶ A presença de microbiota pouco virulenta protege a criança da colonização por micro-organismos potencialmente patogênicos, pois as bactérias da microbiota proliferam-se nos diversos sítios, competindo com organismos patogênicos, com a evolução para doença em proporções menores.⁷

A colonização assintomática por micro-organismos resistentes pode causar de forma subsequente sérias infecções em recém-nascidos, especialmente nos prematuros. Tal fato pode levar a surtos relacionados a patógenos resistentes. A prevenção e o controle das infecções bacterianas em neonatos simbolizam um desafio para os profissionais de saúde.⁸

Na UTIN do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC FMB) – Unesp no período de 1999 a 2003 as taxas de incidência de sepse tardia com hemocultura positiva correspondeu a 9,5% entre todos os neonatos internados.⁹ Já nos anos de 2006 a 2008 as taxas de incidência de sepse tardia correspondeu a 43%, sendo 25% na sepse confirmada e 18% na sepse clínica.¹⁰

RNs que permanecem sob tratamento intensivo são expostos a diversos fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento destas infecções, dentre eles, características como gênero, peso ao nascer, idade gestacional, grau de desenvolvimento imunológico, gravidade da doença,

duração da hospitalização, uso de procedimentos invasivos (cânulas traqueais, cateteres arteriais e venosos, sonda gástrica ou duodenal, derivações ventrículo-peritoneais, drenos torácicos, etc.),¹¹ utilização de antimicrobianos, exposição ao ambiente hospitalar e à equipe multidisciplinar.¹² O desenvolvimento de um processo infeccioso decorre da interação entre diversos fatores de risco associados à debilidade do sistema imunológico dos RNs. A utilização de cânulas endotraqueais e ventiladores mecânicos interferem com os mecanismos de defesa pulmonares locais, a utilização de cateteres favorecem a entrada de bactérias da microbiota cutânea à corrente sanguínea, o uso de bloqueadores H2 levam à redução da acidez gástrica, a hiperalimentação enteral pode ocasionar a veiculação de organismos patogênicos e a utilização de forma prolongada e rotineira de antimicrobianos pode proporcionar a colonização com micro-organismos resistentes.⁸

Atualmente as opções terapêuticas são limitadas em decorrência da produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases.^{13,14} As enterobactérias produtoras de ESBL e carbapenemases emergiram como causa importante de infecções nosocomiais em todo o mundo e são caracterizadas por disseminação rápida e progressiva. Atualmente, representam um importante problema de saúde pública mundial, uma vez que as infecções devidas a esses micro-organismos apresentam alta taxa de mortalidade, com opções terapêuticas limitadas.¹⁵ Os membros da família Enterobacteriaceae são micro-organismos gram-negativos encontrados na natureza e isolados de material biológico, os quais colonizam o trato gastrointestinal dos humanos como parte integrante da microbiota normal destes órgãos, tornando-o um potencial reservatório para esses agentes patogênicos. Esses patógenos podem sobreviver no ambiente e nas mãos de profissionais de saúde favorecendo a transmissão cruzada.^{16,17}

Há também uma crescente preocupação com infecções neonatais causadas por bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGNF), em especial, *Pseudomonas aeruginosa*, por apresentar resistência a múltiplos antibióticos e diversos fatores de virulência.^{18,19,20} Tais micro-organismos podem ser evidenciados em vários ambientes, até mesmo reservatórios úmidos e soluções desinfetantes,¹⁸ apresentam capacidade de colonização de diversos tecidos em decorrência da presença de fímbria, responsável pela motilidade celular, quimiotaxia e mediação das interações superficiais iniciais. Esses micro-organismos podem também produzir exoenzimas que aumentam a capacidade de invasão e proliferação nos tecidos, sendo que a exotoxina A pode ser considerada como um dos principais produtos derivados deste processo, inibidora da síntese de proteínas eucarióticas;^{18,19,20} exoenzima S, substância apoptótica responsável por causar necrose e morte das células imunológicas do hospedeiro;²¹ elastase,

destruidora de colágeno e barreiras físicas do hospedeiro com capacidade de inibição da quimiotaxia dos monócitos,²² protease alcalina que inativa o complemento, proporciona a fagocitose dos neutrófilos e destrói a fibronectina;²³ alginato, fator de proteção das defesas imunológicas, encarregado pela estabilidade estrutural, produção de biofilmes²⁴ e resistência aos antimicrobianos.²⁵

O processo de formação do biofilme inicia-se com a adesão de bactérias planctônicas a uma determinada superfície celular ou inanimada, posteriormente estas se proliferam ocasionando um acúmulo de camadas de células bacterianas e por fim, a formação da comunidade microbiana embebida na matriz de exopolissacarídeo produzida por essas células. A adesão e formação de biofilmes são determinadas pelas peculiaridades do patógeno, como expressão dos fatores de virulência e das características do ambiente onde a bactéria está inserida.^{26,27}

Tais micro-organismos possuem sistemas de comunicação entre si, dentre eles, o *quorum sensing*, uma capacidade de percepção da densidade populacional por meio da secreção de sinais moleculares sintetizados por cada patógeno. Na ocorrência de aderência a dispositivos médico-hospitalares, tais comunidades bacterianas representam uma fonte persistente de contaminação ocasionando infecções graves. Ainda, expressam resistência aos antimicrobianos variando de 500 a 5.000 vezes maior a de patógenos na fase planctônica, dificultando o processo de eliminação.²⁸

O grupo de antimicrobianos beta-lactâmicos engloba fármacos mais comumente utilizados na prática clínica para o tratamento das infecções bacterianas relacionadas à assistência à saúde (IRAS). O mecanismo de ação destas drogas exerce efeitos na integridade da parede celular bacteriana, agem na síntese de peptidoglicano e conseqüentemente na destruição do patógeno. Pertencem a essa classe as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e o carbapenêmicos.²⁹

Opções terapêuticas disponíveis para o tratamento clínico de IRAS foram prejudicadas pelo rápido aparecimento de mecanismos de resistência antimicrobiana. Particularmente uma característica marcante é a capacidade dos bacilos Gram-negativos acumularem resistência cruzada aos antimicrobianos desencadeada pela co-resistência, ou seja, da presença de diversos mecanismos de resistência em um único micro-organismo acarretando a resistência aos múltiplos fármacos, resultando na circulação de estirpes multirresistentes.³⁰

Pesquisas evidenciam quatro mecanismos de resistência bacteriana aos beta-lactâmicos, como a alteração do sítio de ação dos antimicrobianos ou das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), alteração da permeabilidade da membrana celular, efluxo ativo e inativação enzimática principalmente mediante a produção de β -lactamases.³¹

Ao realizarem o processo de ligação às PBPs, os fármacos beta-lactâmicos inibem as enzimas envolvidas nas fases finais da constituição e do arranjo da parede celular de micro-organismos em multiplicação. Tal fato proporciona a formação de um peptidoglicano imaturo e, conseqüentemente ocorre a lise bacteriana. Entretanto, se ocorrer a alteração deste sítio, o fármaco não poderá efetivar a ligação e torna-se ineficiente contra o patógeno. Esse mecanismo de resistência representa o principal em cocos Gram-positivos (Gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*) e em algumas bactérias gram-negativas fastidiosas com a *Neisseria gonorrhoeae*.³²

A modificação da permeabilidade da membrana externa constitui um mecanismo de resistência nos micro-organismos gram-negativos, sendo evidenciada quando há perda ou alteração das proteínas de membrana ou porinas, alterando assim, a penetração e conseqüentemente o mecanismo de ação dos beta-lactâmicos. Esse mecanismo via porinas é restrito a patógenos gram-negativos, em decorrência da inexistência de membrana externa nos micro-organismos Gram-positivos. Os compostos beta-lactâmicos passam com facilidade pela camada de peptidoglicano nas células Gram-positivas, enquanto nas Gram-negativas são transportadas para o interior das células, principalmente por meio de porinas.³³

A propriedade de expulsar ativamente os antimicrobianos para o meio extracelular, devido à bomba de efluxo, tem sido observada tanto em micro-organismos Gram-negativos quanto em Gram-positivos, podendo conferir resistência a uma variedade de antimicrobianos, incluindo os beta-lactâmicos. A resistência aos carbapenêmicos em patógenos Gram-negativos pode ocorrer graças à bomba de efluxo, à redução da permeabilidade e à síntese de β -lactamases.³²

O mecanismo de resistência bacteriana mais importante e frequente é a degradação do antimicrobiano por enzimas, as β -lactamases que hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se às PBPs bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano. Nas bactérias Gram-negativas, o papel das β -lactamases na resistência bacteriana é complexo e extenso. Verifica-se a presença de grandes quantidades de enzimas, muitas delas são capazes de inativar diversos antimicrobianos β -lactâmicos. Além disso, as β -lactamases de bactérias Gram-negativas são secretadas no espaço periplasmático, onde atuam em conjunto com a barreira de permeabilidade da membrana celular externa, podendo alcançar maiores concentrações e agirem de modo mais eficaz sobre os β -lactâmicos que estão atravessando esse espaço para atingir as PBPs, produzindo resistência clinicamente significativa a antimicrobianos.³⁴

Foram descritas numerosas β -lactamases diferentes e essas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos através de plasmídeos ou transposons, podendo ser

produzidas de modo constitutivo ou ser induzido. Os genes que codificam as β -lactamases modificam-se dependendo da localização, o modo de expressão e o tipo de transferência. Essas enzimas podem ser constitutivas quando produzidas independentemente da presença do antimicrobiano, ou induzíveis quando determinados agentes estimulam a produção da enzima pelo micro-organismo.³⁴

Nas β -lactamases mediadas por elementos extracromossômicos, os genes podem estar em elementos móveis como plasmídeos, que são de replicação independente do cromossomo ou estar em transposons que são segmentos de DNA móveis presentes no genoma que podem conter elementos que capturam e mobilizam genes presentes em cassetes. Os plasmídeos podem conter informações que proporcionem benefícios a bactéria (plasmídeos virulentos), como resistência aos antimicrobianos ou conferirem habilidade de dirigir sua transferência de uma célula para outra (plasmídeos conjugativos).²⁹

Os genes de localização extracromossomal podem ser transferidos de forma horizontal entre espécies distintas de bactérias, assim, determinados fenótipos resistentes ou multirresistentes apresentam capacidade de expansão rápida.³⁰ O mecanismo mais comumente associado à transferência gênica em bactérias Gram-negativas é a conjugação que ocorre através do contato físico entre duas células realizado pela pili.³⁴

Diversos fatores contribuem para que uma β -lactamase confira resistência a um beta-lactâmico, dentre eles, a localização celular da β -lactamase, a taxa de hidrólise de enzima dependente da concentração da droga e da velocidade com que o antimicrobiano penetra pela membrana externa dos micro-organismos Gram-negativos, afinidade dos beta-lactâmicos pelas β -lactamases, o tipo de β -lactamase e as condições físico-químicas laboratoriais.³⁵

Três grandes grupos destas enzimas são geralmente distintos, β -lactamases de espectro estendido (ESBL), cefalosporinases classe C (AmpC), e diferentes tipos de β -lactamases com atividade de carbapenemases. As ESBL são um grupo de enzimas de codificação mediada por plasmídios, derivadas das β -lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), possuem espectro hidrolítico ampliado às cefalosporinas de terceira geração e aos monobactâmicos. No ano de 1983 foram detectadas na Alemanha os primeiros isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às cefalosporinas de terceira geração, mas apresentaram sensibilidade à cefoxitina. A análise destas estirpes demonstrou posteriormente que a resistência evidenciada se justificava em decorrência da produção de uma β -lactamase plasmidial transferível, derivada de SHV-1, sendo denominada SHV-2. A partir de então, tem sido relatado mundialmente numerosas enzimas dos tipos TEM e SHV apresentando esse fenótipo de resistência. As ESBL hidrolisam as aminos e ureidopenicilinas, cefalosporinas (exceto as cefamicinas) e os monobactâmicos,

não hidrolisando, entretanto, os carbapenêmicos. A ação hidrolítica destas enzimas é bloqueada pelos inibidores de β -lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam).³⁶

As β -lactamases do tipo AmpC são enzimas mediadas por genes cromossomais praticamente onipresentes entre os micro-organismos Gram-negativos, evidenciando graus variáveis de expressão entre as espécies bacterianas, apresentam-se resistentes a inibição pelo ácido clavulânico e sulbactam e podem ser induzidas por beta-lactâmicos. Tais enzimas podem conferir resistência a quase todos os beta-lactâmicos, englobando as penicilinas de amplo espectro, as cefamicinas, as cefalosporinas de terceira geração, as combinações com inibidores de beta-lactâmicos e aos monobactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos e às cefalosporinas de quarta geração.³¹

As carbapenemases apresentam capacidade de hidrolizar não somente carbapenêmicos, como também os demais beta-lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos. Três grandes classes de carbapenemases são encontradas atualmente em enterobactérias mundialmente: as metalo-beta-lactamases (MBLs), sendo os tipos IMP, VIM e NDM as mais frequentemente detectadas, as OXA carbapenemases, sendo a OXA-48 a mais frequente, e as carbapenemases do tipo KPC. Indiscutivelmente, do ponto de vista epidemiológico são de fundamental relevância as carbapenemases do tipo KPC e as do tipo NDM, pois ambas apresentaram rápida e ampla disseminação mundial posteriormente a suas descrições iniciais.³¹

A metalo-beta-lactamase do tipo NDM (*New Delhi* metalo-beta-lactamase) é uma enzima com atividade em quase todos os betalactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, mantendo a sensibilidade *in vitro* apenas ao aztreonam.³⁴ Foi identificada inicialmente em 2008 em isolado de *Klebsiella pneumoniae* de um morador da Suécia que passou por procedimentos médicos na Índia.³⁶ A partir de então, inúmeros países detectaram o gene *bla*-NDM em isolados de várias espécies bacterianas. No Brasil, em 2013, no Rio Grande do Sul, evidenciou-se a primeira identificação.³¹ Em Santa Catarina, em abril de 2014, a bactéria *Acinetobacter lwoffii* resistente aos carbapenêmicos imipenem e meropenem foi identificada no Laboratório Central de Saúde Pública - Lacen. A cepa bacteriana foi encaminhada ao Laboratório de Referência Nacional da Fundação Oswaldo Cruz onde foi detectado o gene *bla*-NDM pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).³¹

A carbapenemase do tipo KPC é uma enzima que confere resistência aos carbapenêmicos e foi originalmente descrita em bactérias do gênero *Klebsiella*, nos EUA no final dos anos 90.³⁷ Bactérias além das do gênero *Klebsiella* podem carrear o gene *bla*-KPC. O primeiro caso isolado no Brasil no ano de 2006 em Pernambuco.³⁸ Esta enzima já foi identificada em diversos

estados brasileiros podendo causar surtos, sendo alvo de monitoramento constante pelos órgãos fiscalizadores.³¹

Há também grande preocupação com a OXA-48 que apresenta importante atividade contra os carbapenêmicos. Foi identificada inicialmente em 2004 na Turquia e rapidamente se espalhou pela Europa e Oriente Médio.³⁹ No Brasil, foi descrita em 2014 em estudo de prevalência conduzido em Porto Alegre.⁴⁰

A genotipagem dessas cepas apresenta fundamental importância para detecção da relação de patógenos com determinadas infecções, surtos ou transmissão cruzada de micro-organismos, visando evidenciar possível similaridade genética.⁴¹ Para tal, utiliza-se uma ferramenta de tipagem molecular denominada PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis).⁴² Um grande benefício do PFGE é a capacidade de separação de grandes fragmentos de DNA, de forma oposta ao convencional gel de agarose. O cromossomo bacteriano é, portanto, exposto à análise, o método PFGE apresenta capacidade para descrição clara das cepas e evidenciar a relação clonal entre os isolados com alta reprodutibilidade.⁴¹

Mediante a taxas de incidência de colonização e infecção de RNs em UTI por bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas e conseqüentemente o prolongamento do período de internação hospitalar, aumento da taxas de morbidade e mortalidade e elevação dos custos hospitalares, o presente estudo tem como objetivo principal, identificar os fatores de risco para colonização e infecção por micro-organismos Gram-negativos isolados de aspirado traqueal e dos sítios nasal e anal de neonatos da UTIN pertencentes ao Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) coletados previamente em um estudo de coorte prospectivo no período de novembro de 2013 a novembro de 2014, determinar os mecanismos de resistência dos micro-organismos isolados aos antimicrobianos através da produção de β -lactamases, carbapenemases, produção de biofilme, fatores de virulência específicos para *Pseudomonas aeruginosa* e pesquisa de clones prevalentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar micro-organismos Gram-negativos isolados de aspirado traqueal e dos sítios nasal e anal de neonatos da UTIN do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), visando determinar resistência aos antimicrobianos, fatores de virulência, pesquisa de clones prevalentes na Unidade e os fatores de risco para colonização e infecção dos RNs por esses micro-organismos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar genotipicamente as espécies de micro-organismos Gram-negativos isolados de RNs;
- Determinar a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), AmpC e carbapenemases em bactérias Gram-negativas;
- Determinar fenotipicamente a produção de biofilme;
- Pesquisar genotipicamente a presença de marcadores de virulência específicos em *Pseudomonas aeruginosa*;
- Realizar tipagem molecular das bactérias Gram-negativas mais frequentes;
- Identificar os fatores de risco para colonização e infecção por micro-organismos Gram-negativos nos RNs incluídos no estudo.
- Comparar o micro-organismo isolado da amostra clínica com o isolado da colonização.

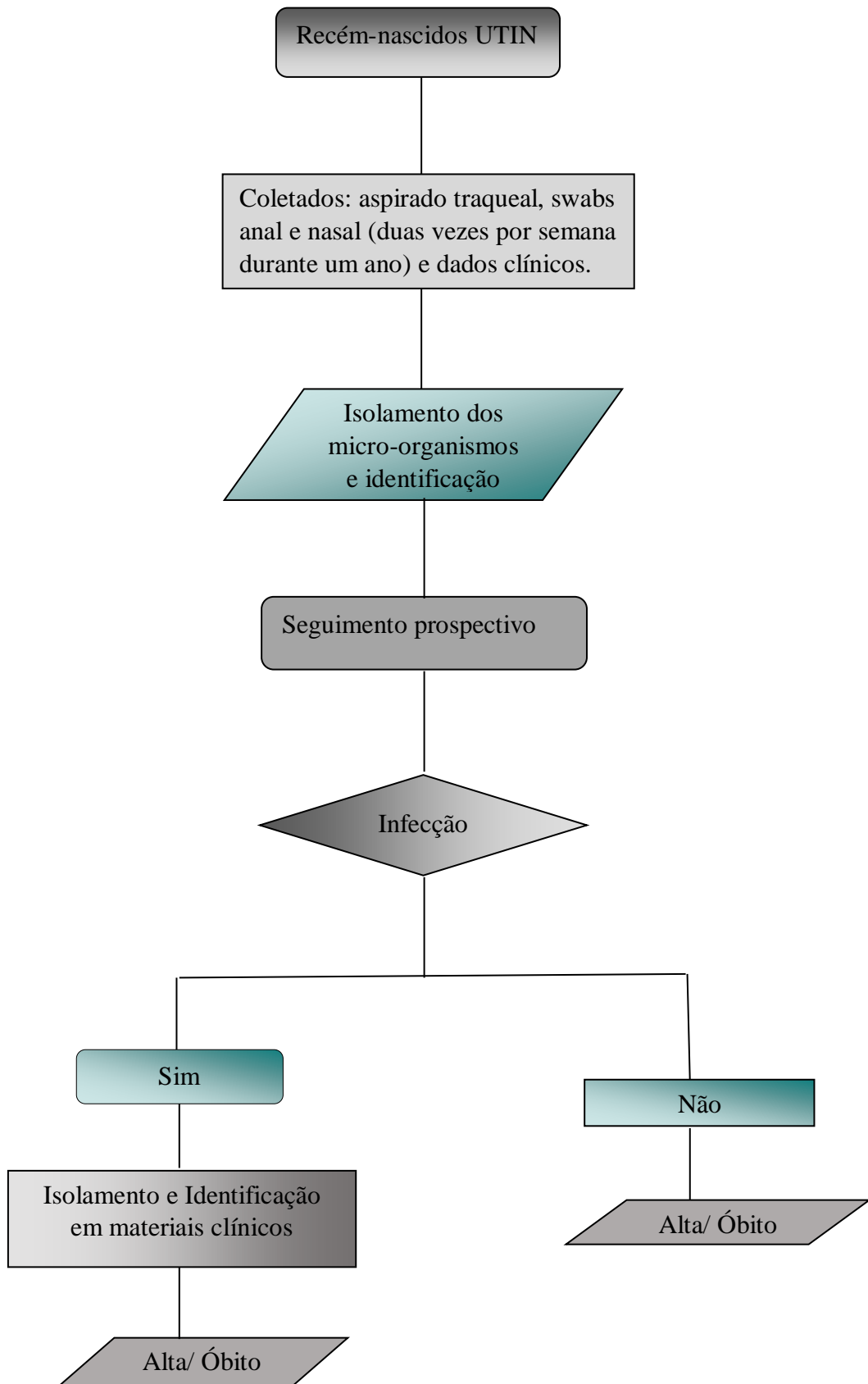
3 METODOLOGIA

3.1 Local de estudo

O estudo foi realizado com amostras de bactérias Gram-negativas isoladas de RNs internados na UTIN pertencente ao Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Centro universitário terciário de alta complexidade, atualmente com 15 leitos e referência regional para atendimento de pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) provenientes da região sudoeste do Estado de São Paulo e de outros Estados vizinhos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Número do Parecer: 1.909.420/CAAE: 63056816.0.0000.5411).

3.2 Delineamento

Foi realizado um estudo de coorte não concorrente, neste, foram incluídos inicialmente todos os recém-nascidos internados na UTI nascidos no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) no período de novembro de 2013 a novembro de 2014, sem manifestações clínicas de infecções bacterianas na admissão, de acordo com os protocolos definidos pela Equipe Médica da Unidade. O delineamento é apresentado no fluxograma a seguir.



3.3 Definições

Colonização: presença do micro-organismo no hospedeiro na ausência de manifestações clínicas e resposta imunológica no momento do isolamento bacteriano.⁴³

Persistência da colonização: Isolamento mesmo patógeno na coleta posterior.

Infecção: Evidência diagnóstica (clínica/laboratorial/microbiológica) posteriormente as primeiras 48/72 horas de vida. Foi considerada como IRAS de origem hospitalar, aquela infecção diagnosticada enquanto o paciente esteve internado na unidade.

Juntamente com um médico da UTIN foi realizado a análise do diagnóstico das infecções dos RNs incluídos no estudo, com base nos registros dos prontuários dos neonatos, utilizando os critérios de diagnóstico conforme preconizado pela Anvisa. Para tanto, foram utilizados os critérios abaixo associados ao Escore de Rodwell.⁴⁴

Para diagnóstico de Infecção da Corrente Sanguínea (ICS) foi utilizado um dos seguintes critérios:

Critério 1: Uma ou mais hemoculturas positivas por micro-organismos não contaminantes da pele e que o micro-organismo não esteja relacionado à infecção em outro sítio;

Critério 2: Pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas sem outra causa não infecciosa reconhecida e sem relação com infecção em outro local (discussão com médico assistente do RN): Instabilidade térmica, bradicardia, apneia, intolerância alimentar, piora do desconforto respiratório, intolerância à glicose, instabilidade hemodinâmica, hipoatividade/letargia.

E pelo menos um dos seguintes:

- Micro-organismos contaminantes comuns da pele (*Staphylococcus coagulase negativa*, *Propionibacterium* spp., *Bacillus* spp., ou *Micrococcus*) cultivados em pelo menos duas hemoculturas colhidas em dois locais diferentes, com intervalo máximo de 48 horas entre as coletas.

Para o diagnóstico de pneumonia foram analisados os seguintes critérios dos RNs intubados:

- **Critério radiológico:** 1 (uma) ou mais radiografias de tórax seriadas com um dos seguintes achados: infiltrado persistente, novo ou progressivo:

- ✓ Consolidação;

- ✓ Cavitação;
 - ✓ Pneumatocele.
- **Sinais e sintomas:** Piora da troca gasosa (por exemplo: piora da relação PaO₂/ FiO₂, aumento da necessidade de oferta de oxigênio, aumento dos parâmetros ventilatórios).

E pelo menos 03 (três) dos sinais e sintomas:

- ✓ Instabilidade térmica (temp. axilar > de 37,5 °C ou < que 36°C) sem outra causa conhecida;
- ✓ Leucopenia ou leucocitose com desvio a esquerda (considerar leucocitose ≥ 25.000 ao nascimento ou ≥ 30.000 entre 12 e 24 horas ou acima de $21.000 \geq 48$ horas e leucopenia ≤ 5.000);
- ✓ Hemograma com ≥ 3 parâmetros alterados (vide escore hematológico anexo C);
- ✓ Mudança do aspecto da secreção traqueal, aumento da secreção respiratória ou aumento da necessidade de aspiração e surgimento de secreção purulenta;
- ✓ Sibilância, roncos. Bradicardia (160 batimentos/min).

Para confirmar infecção do trato urinário os seguintes critérios foram analisados:

- **Presença de 01 dos seguintes sinais e sintomas sem causa reconhecida:**
- ✓ Instabilidade térmica (temperatura axilar acima de 37,5° C ou menor que 36,0°C);
 - ✓ Apneia;
 - ✓ Bradicardia;
 - ✓ Baixo ganho ponderal;
 - ✓ Hipoatividade/letargia;
 - ✓ Vômitos
 - ✓ Urocultura positiva (maior ou igual a 10⁵ colônias por mL) com não mais que duas espécies de micro-organismos. No caso de urina colhida através de punção suprapúbica, foi valorizado qualquer crescimento de não mais de duas espécies de micro-organismos

3.4 Coleta de dados clínicos

Para análise dos fatores de risco para colonização e infecção foram obtidos dados pessoais e clínicos a partir da análise de prontuários dos pacientes. Foram coletados os dados referentes a variáveis maternas e do RN:

- Sexo do RN.
- Tipo de Parto.
- Idade gestacional (IG).
- Peso ao nascimento.
- Cateterização venosa central ou periférica.
- Intubação endotraqueal (ventilação mecânica).
- Procedimentos cirúrgicos.
- Nutrição parenteral.
- Antibioticoterapia prévia.
- Dados laboratoriais.
- Óbito.

3.5 Coleta dos espécimes microbiológicos

As amostras foram previamente coletadas da mucosa nasal, anal e aspirado traqueal em estudo de coorte prospectivo no período de novembro de 2013 a novembro de 2014 em neonatos nascidos e internados na UTIN do HC da FMB. As coletas foram realizadas duas vezes por semana durante o tempo de permanência do RN na UTIN. As amostras foram isoladas, identificadas fenotipicamente e mantidas a -70°C . Foram incluídos no estudo 300 enterobactérias e 50 bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose isolados no período.

Amostras da mucosa nasal e anal de neonatos foram coletadas através de *swabs*. Os espécimes foram obtidos das narinas anteriores e da superfície dos tecidos supracitados, utilizando um *swab* para cada sítio. A técnica de coleta nasal consistiu na umidificação do *swab* com Soro fisiológico 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas às narinas e rotação da haste pressionando gentilmente a extremidade contra a mucosa. A coleta na região anal, também foi realizada com *swab* embebido em solução fisiológica através de uma fricção (de forma suave) sobre a superfície do tecido do RN.

O aspirado traqueal foi coletado a partir do processo de aspiração, com esterilidade total da sonda de aspiração, luvas estéreis, máscara, avental apropriado e frasco estéril objetivando quantificar o provável patógeno.

Durante o desenvolvimento da pesquisa os RNs foram acompanhados até desfecho final de alta hospitalar ou óbito, e na ocorrência de infecção durante o período de internação, os materiais clínicos obtidos para diagnóstico no Laboratório Clínico do HC da FMB foram também incluídos no estudo.

3.6 Identificação genotípica dos patógenos

Os bacilos Gram negativos foram identificados por técnica de PCR utilizando primers de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S, específicos para cada espécie e realizados conforme os parâmetros de temperatura, número de ciclos e tempo de amplificação conforme descrito nos artigos referenciados no Quadro 1.

A amplificação foi realizada em termociclador, usando uma mistura padronizada de 2,5µL de tampão para PCR, 1,0µL de primer forward, 1,0µL de primer reverse, 0,2µL de Taq polimerase, 0,5µL de dNTP e 1,0µL de MgCl₂ 3mM.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão 1,0 X TBE e corado com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas linhagens de referência internacional: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Proteus mirabilis* (ATCC 15290), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Serratia marcescens* (ATCC14756).

As bactérias que não puderam ser identificadas pela técnica de PCR foram submetidas à identificação por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) no equipamento VITEK MS (bioMérieux).

Quadro 1 - Primers para identificação de enterobactérias e das espécies de bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados de neonatos da UTIN do HC da FMB.

Espécies	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Fragmento Amplificado (pb)	Referência
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Primer 1 TAATGCTTTGATCGGCCTTG Primer 2 TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	45
<i>Enterobacter cloacae</i>	Primer 1 GGTAGAAGAAGGCGTGGTTGC Primer 2 ATGCATTCGGTGGTGATCATCAG	343	46
<i>Escherichia coli</i>	Primer 1 GTGACAAAAGCCCGGACACCATAAAATGCCT Primer 2 TACTGTGCATTACGTTGCGGATTTGGCGT	903	47
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Primer 1 GCGTGGCGGTAGATCTAAGTCATA Primer 2 TTCAGCTCCGCCACAAAGGTA	364	47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Primer 1 TATTTCAAGGATGGCTCCAC Primer 2 GCGTTCGTTGTCCAAGTTTA	724	48
<i>Serratia marcescens</i>	Primer 1 GGTGAGCTTAATACGTTTCATCA Primer 2 TACGGGTACCTTGTACGACTT	1058	49
<i>Proteus mirabilis</i>	Primer 1 TCGATTTCAAGTGTGGCCAT Primer 2 CCGAGCTTCATCATGGCTG	236	50

3.7 Produção de Biofilme

As amostras de enterobactérias e das espécies de bacilos Gram-negativos não fermentadores foram semeadas em caldo de tripticase de soja (TSB) enriquecido com glicose e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Para avaliar a capacidade das amostras em aderir a superfícies abióticas, foram empregadas placas de poliestireno com 96 orifícios. Em cada orifício foi adicionado 200 µl de TSB e 10µl da suspensão bacteriana (correspondendo a aproximadamente 10⁸ UFC/mL). As placas inoculadas foram incubadas à temperatura de 37°C

por 24 e 48 horas. Após o período de incubação as placas foram lavadas com PBS por quatro vezes com o intuito de remover as bactérias não aderentes. Bactérias aderidas à superfície abiótica foram então fixadas com formalina (2%). Após 20 minutos de fixação, a formalina foi removida e as preparações lavadas novamente quatro vezes com água.

Em seguida as preparações foram coradas com uma solução de cristal violeta (1%) por aproximadamente 20 minutos. Após esse período, as preparações foram lavadas por três vezes com água com o intuito de remover o excesso de corante. Após um período de secagem, o corante foi solubilizado com metanol (por aproximadamente 10 minutos), e a DO₅₄₀ determinada⁵¹. O score utilizado para classificação de produção de biofilme foi dividido em quatro categorias: cepa não produtora: (quando a DO da cepa foi menor que a DO do branco), fraca (DO da cepa entre a DO do branco e 2x a DO do mesmo), média (DO da cepa entre 2x a DO do branco e 4x a DO do Branco) e forte (DO da amostra maior que 4x a DO do Branco).⁵¹

As cepas de *Escherichia coli* O42 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 foram utilizadas como controle positivo nos testes, e como controle negativo foi utilizado a cepa de *Escherichia coli* K12 HB101.

3.8 Confirmação da produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Para a confirmação da produção de enzimas ESBL foi utilizado o método fenotípico confirmatório recomendado pela Anvisa, através da técnica de aproximação de discos. Foram utilizados um disco de amoxicilina com ácido clavulânico, situado no centro da placa e distante a 30 mm (de centro a centro) dos outros discos de β -lactâmicos: ceftazidima, cefotaxima/ceftriaxona e aztreonam. O aumento do diâmetro do halo de inibição ou o aparecimento da zona fantasma, distorção do halo ao redor dos discos de β -lactâmicos, indicou a presença de uma amostra produtora de ESBL.⁵²

Para os bacilos Gram-negativos não fermentadores esta técnica não é realizada por apresentarem resistência intrínseca à maioria dos β -lactâmicos.⁵³

3.9 Determinação da produção de β - lactamases AmpC

A determinação da produção de β - lactamases AmpC foi realizada utilizando a técnica fenotípica de aproximação de discos. Os discos de ceftazidime e ceftriaxona foram colocados a uma distância de 25 mm do disco de cefoxitina. A cefoxitina funciona como um indutor da enzima AmpC formando uma zona de achatamento no halo dos discos de ceftazidime e/ou

ceftriaxona. O achatamento de um dos discos, resistência à cefoxitina e sensibilidade ao disco de cefepime indicou a presença de uma amostra produtora de β - lactamases AmpC.⁵⁴

3.10 Detecção de micro-organismos produtores de carbapenemases

Para detecção foi utilizado o método fenotípico determinado pela ANVISA (2013)⁵⁵ e então testado simultaneamente ertapenem, imipenem e meropenem. Caso o isolado apresentasse sensibilidade aos três carbapenêmicos (ertapenem, imipenem, meropenem), o resultado era liberado como tal, quanto a esse grupo de antimicrobianos. Para triagem de produtores de carbapenemase em isolados do Grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) foram considerados apenas os resultados de imipenem e meropenem, enquanto para isolados NÃO pertencentes ao Grupo CESP o ertapenem também foi utilizado. Isolados com diâmetro de halo de inibição ≤ 22 mm ou com Concentração Inibitória Mínima (MIC) ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para imipenem e/ou meropenem, e isolados com diâmetro do halo de inibição ≤ 24 mm, ou CIM ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ para ertapenem foram testados, de modo suplementar, com discos de meropenem e imipenem com e sem adição de EDTA, cloxacilina (CLOXA) e ácido fenilborônico (AFB).

3.11 Extração do DNA bacteriano

O DNA total foi extraído a partir de amostras cultivadas em ágar MacConkey e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h.

A extração foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células com proteinase K (20 mg/ml). A seguir 500 μl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 μl de solução de extração foram adicionados novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 μl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e posteriormente submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 μl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi mantido a -20°C.

3.12 Caracterização molecular das amostras produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), produção de β - lactamases AmpC e Carbapenemases

Todas as amostras produtoras de ESBL, β - lactamases AmpC e carbapenemases nos métodos fenotípicos foram avaliadas por PCR para a presença de genes relacionados a esses fenótipos, empregando-se primers e protocolos conforme referências descritas no **Quadro 2**.

3.13 Avaliação do perfil de virulência das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

A avaliação do perfil de virulência foi realizada apenas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual as amostras foram avaliadas quanto à presença dos genes que codificam o alginato (*algD*), elastase (*lasB*), fosfolipase C hemolítica (*plcH*), fosfolipase C não hemolítica (*plcN*), exoenzima S (*exoS*) e exotoxina A (*toxA*). O protocolo para cada reação de PCR e respectivos primers (**Quadro 3**) foi executado conforme descrito por Lanotte et al⁵⁶. As amplificações foram realizadas usando-se os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 58°C por 1 min e extensão a 72°C por 1,50 min, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2% corados com *Syber safe* utilizando luz UV para visualização das bandas.

Quadro 2 - Iniciadores para amplificação dos genes relacionados à produção de β - lactamases de espectro estendido (ESBL), β - lactamases AmpC e carbapenemases.

Genes de Resistência	Primers (5'-3')	Referência
<i>blaTEM</i>	TCGGGGAAATGTGCGCG TGCTTAATCAGTGAGGACCC	57
<i>blaSHV</i>	CACTCAAGGATGTATTGTG TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	57
<i>blaCTX-M-1 group</i>	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	57
<i>blaCTX -M-2 group</i>	TGATGACTCAGAGCATTCTG TGGGTTACGATTTTCGCCGC	57
<i>blaCTX -M-8 group</i>	TCGCGTTAAGCGGATGATGC AACCCACGATGTGGGTAGC	57
<i>blaCTX-M-9 group</i>	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA CCCTTCGGCGATGATTCTC	57
<i>blaCTX-M-15</i>	CACACGTGGAATTTAGGGACT GCCGTCTAAGGCGATAAACA GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	57 58
<i>MOX</i>	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	58
<i>CIT</i>	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	58
<i>DHA</i>	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	58
<i>ACC</i>	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	58
<i>EBC</i>	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	58
<i>FOX</i>	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG ACACAATACATATCAACTTCGC	59
<i>blaOXA-1 group</i>	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC TCAACTTTCAAGATCGCA	59
<i>blaOXA-47</i>	GTGTGTTTAGAATGGTGA TTGGT GGCATCGATTATCGG	59
<i>blaOXA-48</i>	GAGCACTTCTTTTGTGATG GC GACAGCCTCTTTCTCCACA	59
<i>blaCMY-2</i>	TGGAACGAAGGCTACGTA GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	59
<i>blaNDM-1</i>	CGGAATGGCTCATCACGATC GCT CAG GCG CAA CTG TAA G	57
<i>blaKPC</i>	AGCACAGCGGCAGCAAGAAAG	60

Quadro 3 - Iniciadores para amplificação dos genes codificadores dos fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa*.

Fator de virulência	Gene	Iniciador	Seqüência (5'-3')	Produto pb
Alginato	<i>algD</i>	<i>algD1</i>	ATGCGAATCAGCATCTTTGGT	1310
		<i>algD2</i>	CTACCAGCAGATGCCCTCGGG	
Exoenzima S(citotoxina)	<i>exoS</i>	<i>exoS1</i>	CTTGAAGGGACTCGACAAGG	504
		<i>exoS2</i>	TTCAGGTCCGCGTAGTGAAT	
Fosfolipase C hemolítica	<i>plcH</i>	<i>plcH1</i>	GAAGCCATGGGCTACTTCAA	307
		<i>plcH2</i>	AGAGTGACGAGGAGCGGTAG	
Fosfolipase C não hemolítica	<i>plcN</i>	<i>plcN1</i>	GTTATCGCAACCAGCCCTAC	466
		<i>plcN2</i>	AGGTGGAACACCTGGAACAC	
Exotoxina A	<i>toxA</i>	<i>toxA1</i>	GGTAACCAGCTCAGCCACAT	352
		<i>toxA2</i>	GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	
Protease alcalina	<i>aprA</i>	<i>aprA1</i>	ACCCTGTCCTATTCGTTCC	140
		<i>aprA2</i>	GATTGCAGCGACAACCTGG	
Elastase	<i>lasB</i>	<i>lasB1</i>	GGAATGAACGAAGCGTTCTC	300
		<i>lasB2</i>	GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	
Ramnolipídeos	<i>rhlAB</i>	<i>rhlAB1</i>	TCATGGAATTGTCACAACCGC	151
		<i>rhlAB2</i>	ATACGGCAAAATCATGGCAAC	

3.14 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O PFGE dos micro-organismos colonizantes (swabs) e isolados de materiais clínicos foi realizado segundo o protocolo preconizado pelo PulseNet.⁶¹

Os isolados foram semeados em ágar BHI onde cresceram por no máximo 18 horas. Após este processo foi realizada a verificação da pureza das amostras, preparo da cultura bacteriana, preparo da suspensão bacteriana de modo a obter uma DO de 0,8 a 1,0 em espectrofotômetro a 610 nm ou 17-18% de transmitância em colorímetro para a confecção dos blocos (plugs) de agarose contendo amostras de DNA. Em seguida foi realizada a lise das células no bloco de agarose com solução de lise (Tris 50 mM: EDTA 50mM, pH 8,0, sarcosyl 1%, 0,1 mg/ml de Proteinase K [20 mg/ml]). Após a lavagem dos blocos de agarose, estes foram mantidos em tampão TE em geladeira até o momento do uso. A restrição enzimática foi feita em um terço do plug com enzimas específicas em 50µl de tampão de restrição, sendo que para

micro-organismos gram-negativos fermentadores foi utilizada a enzima *XbaI* (10 U/ μ L - Thermo Fisher Scientific) e para os não fermentadores foi utilizada a *SpeI* (10 U/ μ L - Thermo Fisher Scientific) para *Pseudomonas aeruginosa* e a *ApaI* (10 U/ μ L - Thermo Fisher Scientific) para *Acinetobacter baumannii*.

A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 6,76s a 35,38s por 18h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (*New England BioLabs*) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV.

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,5% e 1%, respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para determinação dos *clusters*. Agrupamentos com três ou mais isolados com similaridade maior ou igual a 80% foi considerado um *cluster*.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados foi utilizado o software SPSS versão 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Empregou-se uma análise uni e multivariada de regressão de Cox para fatores de risco associados à colonização de neonatos por Enterobactérias e/ou bacilos Gram-negativos não fermentadores. Para seleção das variáveis incluídas na análise multivariada a estratégia de seleção *Forward* foi utilizada, com as variáveis incluídas no modelo de forma sequencial conforme p-valor crescente. O critério para permanência no modelo foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Amostras

Foram estudados 179 neonatos da UTIN do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), destes, 97 (54,2%) RNs estavam colonizados por micro-organismos Gram-negativos e seis (3,3%) infectados por espécies de bactérias Gram-negativas (**Figura 1 e 2**). As amostras foram coletadas no período compreendido entre novembro de 2013 e novembro de 2014 em três sítios em cada recém-nascido incluído no estudo: mucosa nasal (MN), mucosa anal (MA) e aspirado traqueal (AT).

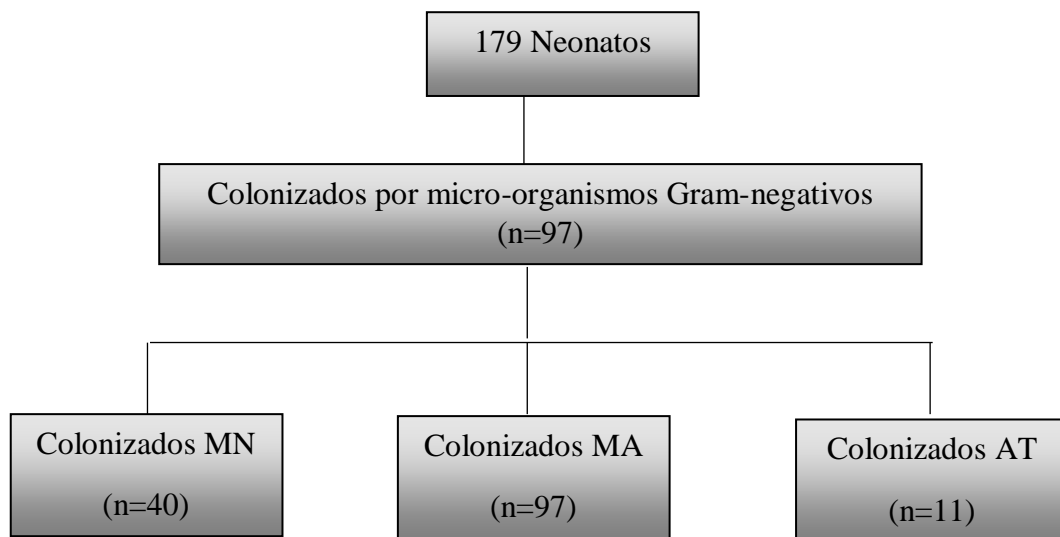


Figura 1 - Número de recém-nascidos colonizados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. MN: mucosa nasal, MA: mucosa anal, AT: Aspirado traqueal.

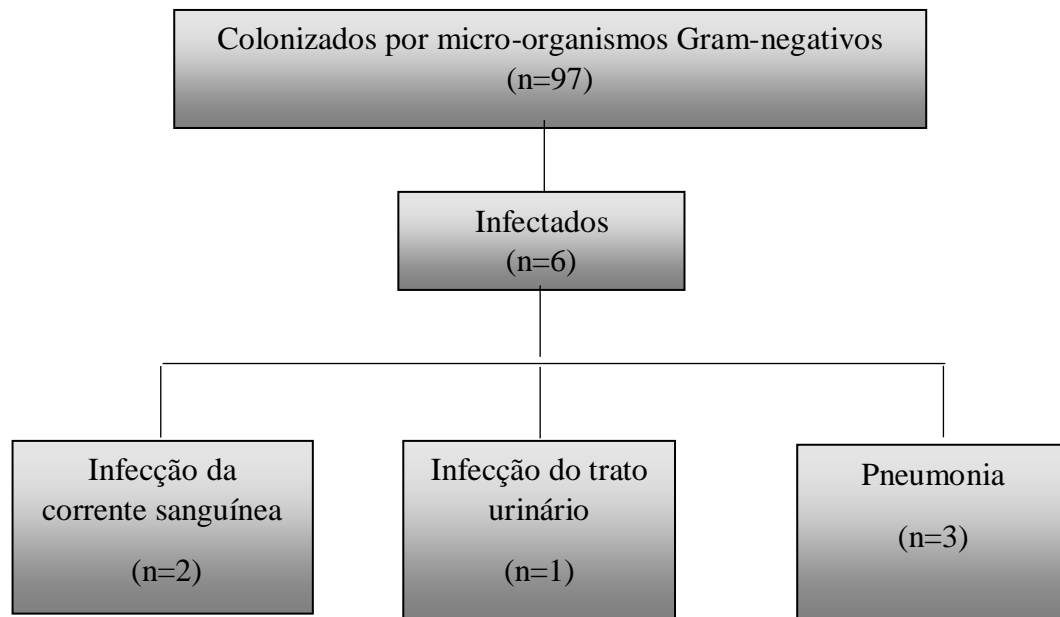


Figura 2 - Número de recém-nascidos infectados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

5.2 Características da população estudada

A **Tabela 1** descrita abaixo demonstra as características dos RNs incluídos no estudo.

Tabela 1 - Características dos neonatos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu incluídos no estudo.

Características	Frequência *
Sexo masculino	54 (55,7)
Idade gestacional (semanas)**	28,5 (27,0-34,0)
Peso (x100g)**	13,0 (10,0-18,5)
Parto cesáreo	59 (60,8)
Cateter umbilical	43 (44,3)
Cateter central de inserção periférica (PICC)	68 (70,1)
Intracath	7 (7,2)
Acesso venoso periférico	64 (66,0)
Nutrição parenteral	72 (74,2)
Cirurgia	18 (18,6)
Ventilação mecânica	81 (83,5)
Uso de antibiótico nas primeiras 72 horas***	45 (46,4)

*Dados em n (%) exceto para variáveis com dois asteriscos

** Mediana (quartis)

***Penicilina, Ampicilina, Gentamicina

5.3 Identificação dos Micro-organismos

Durante o período do estudo 600 amostras apresentaram morfologia e coloração específica para bacilos Gram-negativos. Destas, 350 (58,3%) foram submetidas a identificação genotípica por PCR (**Tabelas 2 e 3**). As bactérias que não puderam ser identificadas pela técnica de PCR foram submetidas à identificação por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) no equipamento VITEK MS (bioMérieux).

Tabela 2 - Enterobactérias isoladas da Mucosa Nasal, Mucosa Anal e Aspirado Traqueal de neonatos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

	Total de Isolados		Mucosa Nasal		Mucosa Anal		Aspirado Traqueal	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	135	(45)	30	(22,2)	101	(74,9)	4	(2,9)
<i>Serratia marcescens</i>	73	(24,3)	16	(21,9)	53	(72,6)	4	(5,5)
<i>Escherichia coli</i>	45	(15)	14	(31,1)	29	(64,4)	2	(4,5)
<i>Klebsiella aerogenes</i> *	17	(5,7)	1	(5,9)	16	(94,1)	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> *	12	(4)	-	-	10	(83,3)	2	(16,7)
<i>Citrobacter freundii</i> *	7	(2,3)	-	-	7	(100)	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	(1,3)	-	-	2	(50)	2	(50)
<i>Citrobacter diversus</i> *	2	(0,7)	-	-	2	(100)	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	2	(0,7)	-	-	2	(100)	-	-
<i>Raoultella planticola</i> *	1	(0,3)	-	-	1	(100)	-	-
<i>Raoultella ornithinolitica</i> *	1	(0,3)	-	-	1	(100)	-	-
<i>Cedecea neteri</i> *	1	(0,3)	-	-	1	(100)	-	-
TOTAL	300	(100,0)	61	(20,3)	225	(75)	14	(4,7)

N: número de amostras

*Micro-organismos identificados por Espectrometria de Massa - MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) no equipamento VITEK MS (bioMérieux).

Tabela 3- Bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados da Mucosa Nasal, Mucosa Anal e Aspirado Traqueal de neonatos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

	Total de Isolados		Mucosa Nasal		Mucosa Anal		Aspirado Traqueal	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38	(76)	16	(42,1)	22	(57,9)	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	(20)	2	(20)	7	(70)	1	(10)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> *	2	(4)	-	-	2	(100)	-	-
TOTAL	50	(100,0)	18	(36,0)	31	(62)	1	(2,0)

N: número de amostras

*Micro-organismo identificado por Espectrometria de Massa - MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) no equipamento VITEK MS (bioMérieux).

5.4 Determinação da colonização e infecção em recém-nascido

5.4.1 Colonização

Foi realizada a determinação da colonização do RN pelos micro-organismos isolados nas coletas, sendo constatada maior frequência de colonização por micro-organismos Gram-negativos principalmente na MA, MN e AT, respectivamente (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Frequência de colonização por micro-organismos Gram-negativos isolados da mucosa anal, mucosa nasal e aspirado traqueal de recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

Espécies	MN (N=40*)		MA (N=97)		AT(N=11)	
	RN	%	RN	%	RN	%
<i>Enterobacter cloacae</i>	17	(42,5)	31	(31,9)	3	(27,3)
<i>Serratia marcescens</i>	10	(25,0)	15	(15,5)	3	(27,3)
<i>Escherichia coli</i>	8	(20,0)	13	(13,4)	2	(18,2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	(2,5)	10	(10,3)	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	8	(8,2)	1	(9,1)
<i>Citrobacter freundii</i>	1	(2,5)	3	(3,1)	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	1	(1,0)	1	(9,1)
<i>Citrobacter diversus</i>	-	-	2	(2,0)	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	2	(2,0)	-	-
<i>Raoultella planticola</i>	-	-	1	(1,0)	-	-
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-	-	1	(1,0)	-	-
<i>Cedecea neteri</i>	-	-	1	(1,0)	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	(12,5)	6	(6,2)	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	(7,5)	1	(1,0)	1	(9,1)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	(2,5)	2	(2,0)	-	-

RN: recém-nascido; MN: mucosa nasal; MA: mucosa anal; AT: aspirado traqueal. *Seis RNs estavam colonizados na MN por mais de um micro-organismo concomitantemente.

A análise do tempo em dias da data da admissão e posterior colonização por micro-organismos Gram-negativos, revelou maior número de RNs colonizados em até 16 dias da admissão (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Tempo em dias de colonização de neonatos por patógenos Gram-negativos.

Admissão	8 dias	16 dias	24 dias	>32 dias
2	24	48	11	12

5.4.2 Infecção

Durante o seguimento dos RNs, constatou-se 34 (36,5%) crianças com infecção ao longo do período de internação. Dos 97 RNs colonizados, seis (6,2%) foram confirmados com infecção com cultura microbiológica. Entre os patógenos Gram-negativos isolados dos materiais clínicos pôde ser constatado duas *Klebsiella pneumoniae* e um *Acinetobacter baumannii* isolados de hemocultura, um *Proteus mirabilis* encontrado em cultura de urina, duas *Serratia marcescens* e uma *Klebsiella oxytoca* isoladas de aspirado traqueal (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Frequência de infecção por micro-organismos isolados de hemocultura, aspirado traqueal e cultura de urina de recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

Espécies	ICS		P		ITU	
	RN	%	RN	%	RN	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	1	16,7	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	16,7	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	2	33,3	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	1	16,7	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	1	16,7

RN: recém-nascido; ICS: Infecção da corrente sanguínea; P: pneumonia; ITU: infecção do trato urinário. * Duas amostras de *K. pneumoniae* foram isoladas de duas hemoculturas do mesmo RN.

No decorrer de 24 dias foram observados 7 casos de infecção, destes, 3 (42,8%) estão relacionados a hemoculturas, 1 (14,4%) caso relacionado à cultura de urina e 3 (42,8%) casos associados à pneumonia (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Determinação de quanto tempo (em dias), posteriormente à colonização, pode ser constatado o desenvolvimento de infecção por micro-organismos Gram-negativos.

1 dia	8 dias	16 dias	24 dias
1	3	2	1

5.5 Produção de biofilme

A determinação da produção de biofilme foi realizada em 350 bacilos Gram-negativos, destes 335 (95,7%) foram produtores de biofilme.

A produção de biofilme foi classificada em forte, média ou fraca, de acordo com a densidade óptica obtida. Dentre as enterobactérias 285 (95%) foram produtoras, houve 22 (7,7%) fortes produtoras, 81 (28,4%) médias e 182 (63,8%) fracas produtoras. No grupo dos bacilos gram-negativos não fermentadores, 50 (100%) dos isolados foram produtores, sendo constatado 23 (46%) fortes produtores, 11 (22%) médios produtores e 16 (32%) fracos produtores de biofilme.

Enterobacter cloacae foi a espécie que apresentou maior taxa de produção de biofilme (96,3%) quando comparada às outras Enterobactérias. Já no grupo dos bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foram fortes produtores em 100% dos seus isolados (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Determinação da produção de biofilme em micro-organismos Gram-negativos isolados de recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

	Número de isolados produtores N (%)	Fortes Produtores N (%)	Médios Produtores N (%)	Fracos Produtores N (%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	130 (96,3)	6 (4,6)	23 (17,7)	101 (77,7)
<i>Serratia marcescens</i>	73 (100)	11 (15,0)	41 (56,2)	21 (28,8)
<i>Escherichia coli</i>	38 (84,4)	-	1 (2,6)	37 (97,4)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	14 (82,3)	1 (7,2)	5 (35,7)	8 (57,1)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12 (100)	2 (16,7)	7 (58,3)	3 (25)
<i>Citrobacter freundii</i>	7 (100)		1 (14,3)	6 (85,7)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (100)	2 (50)	1 (25)	1 (25)
<i>Citrobacter diversus</i>	2 (100)	-	-	2 (100)
<i>Proteus mirabilis</i>	2 (100)	-	2 (100)	-
<i>Raoultella planticola</i>	1 (100)	-	-	1 (100)
<i>Raoultella ornithinolitica</i>	1 (100)	-	-	1 (100)
<i>Cedecea neteri</i>	1 (100)	-	-	1 (100)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38 (100)	21 (55,2)	11 (29)	6 (15,8)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10 (100)	2 (20)	-	8 (80)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2 (100)	-	-	2 (100)
Total de amostras	335	45	92	198

N: número de isolados positivos.

5.6 Produção de β - lactamases de espectro estendido (ESBL)

O teste de aproximação de discos foi realizado para as 300 enterobactérias isoladas. Destas, 16 (5,3%) demonstraram o aparecimento da zona fantasma, distorção do halo ao redor do disco β -lactâmico, indicando a produção de ESBL. Os genes dos tipos *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX* do grupo 9, *blaCMY-2* foram detectados em alguns desses isolados (**Tabela 9**). Dentre os 16 isolados produtores de ESBL fenotipicamente, seis apresentaram genes de resistência, destes, quatro (66,7%) apresentaram o gene *blaCTX-M* do grupo 9, três (50%) apresentaram o gene *blaTEM* e um (16,7%) foi positivo para o gene *blaSHV* e *blaCMY-2*.

Tabela 9 - Genes de resistência observados em enterobactérias isoladas da mucosa nasal, anal e de hemocultura de recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

Amostras	Espécies	Genes de resistência
21A/1G/24/12	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-
107A/17/4	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>blaCTX-M</i> do grupo 9, <i>blaTEM</i>
107A/8/5	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>blaCTX-M</i> do grupo 9, <i>blaTEM</i>
166A/16/9	<i>Klebsiella aerogenes</i>	-
78A/11/3	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
78A/20/3	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
69A/4/3	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaCTX-M</i> do grupo 9
107A/24/4	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaSHV</i>
107A/15/5	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaTEM</i>
167A/14/8	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaCTX-M</i> do grupo 9
182A/7/10	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
44N/16/1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
147N/31/7	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
166N/19/8	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
107H/22/4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
107H/24/4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-

G: recém-nascido gemelar; N: mucosa nasal; A: mucosa anal; AT: aspirado traqueal; H: hemocultura

5.7 Determinação da produção de β - lactamases AmpC

O teste de aproximação de discos foi realizado para os 350 micro-organismos Gram-negativos estudados, destes, 23 produziram β -lactamases do Tipo AmpC, sendo 13 (56,5%) isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, seis (26,1%) isolados de *Escherichia coli*, dois (8,7%) isolados de *Enterobacter cloacae*, um (4,3%) de *Klebsiella aerogenes* e um (4,3%) de *Serratia marcescens*.

Dentre os 20 isolados produtores de β -lactamases do Tipo AmpC, dois apresentaram o genótipo EBC, sendo um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* e um de *Enterobacter cloacae*. Um isolado de *Enterobacter cloacae* também apresentou o gene *blaCMY-2*.

5.8 Produção de Carbapenemases

Nos 350 micro-organismos Gram-negativos estudados não foi possível observar a produção de carbapenemases, todos os isolados quando submetidos aos testes iniciais de triagem apresentaram sensibilidade ao imipenem, ertapenem e meropenem.

5.9 Perfil de virulência dos isolados de *P. aeruginosa*

A determinação genotípica de marcadores de virulência foi realizada nos 38 isolados de *P. aeruginosa*.

A avaliação demonstrou que 38 (100%) das amostras foram positivas para o gene do alginato D, 21 (55,3%) para o gene que codifica a exoenzima S, 38 (100%) para o gene da fosfolipase C hemolítica, 34 (89,5%) para o gene codificador da fosfolipase C não hemolítica, 38 (100%) para o gene da exotoxina A, 38 (100%) para o gene da protease alcalina, 38 (100%) para o gene da elastase e 38 (100%) para o gene que codifica os ramnolipídeos (**Figura 3**).

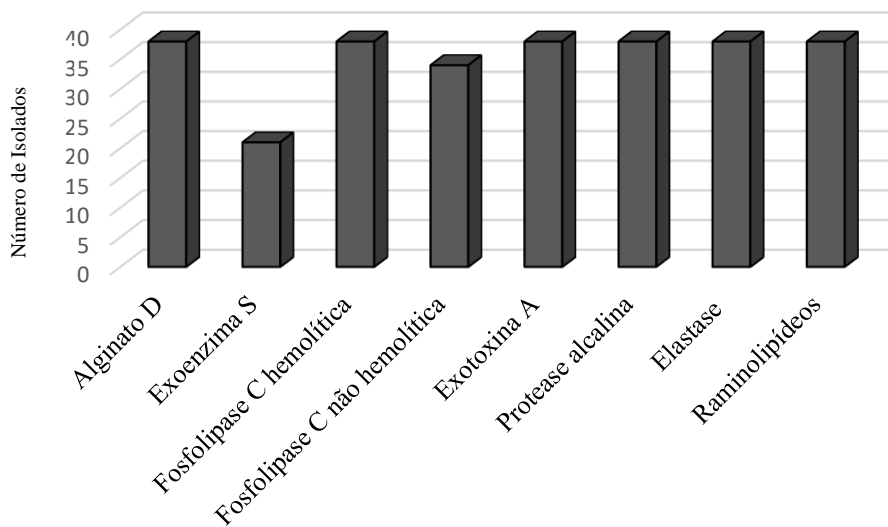


Figura 3 - Frequência de genes que codificam fatores de virulência específicos para *P. aeruginosa* encontrados em isolados na mucosa nasal (MN), anal (MA) e aspirado traqueal (AT) de neonatos da UTIN do HC da FMB.

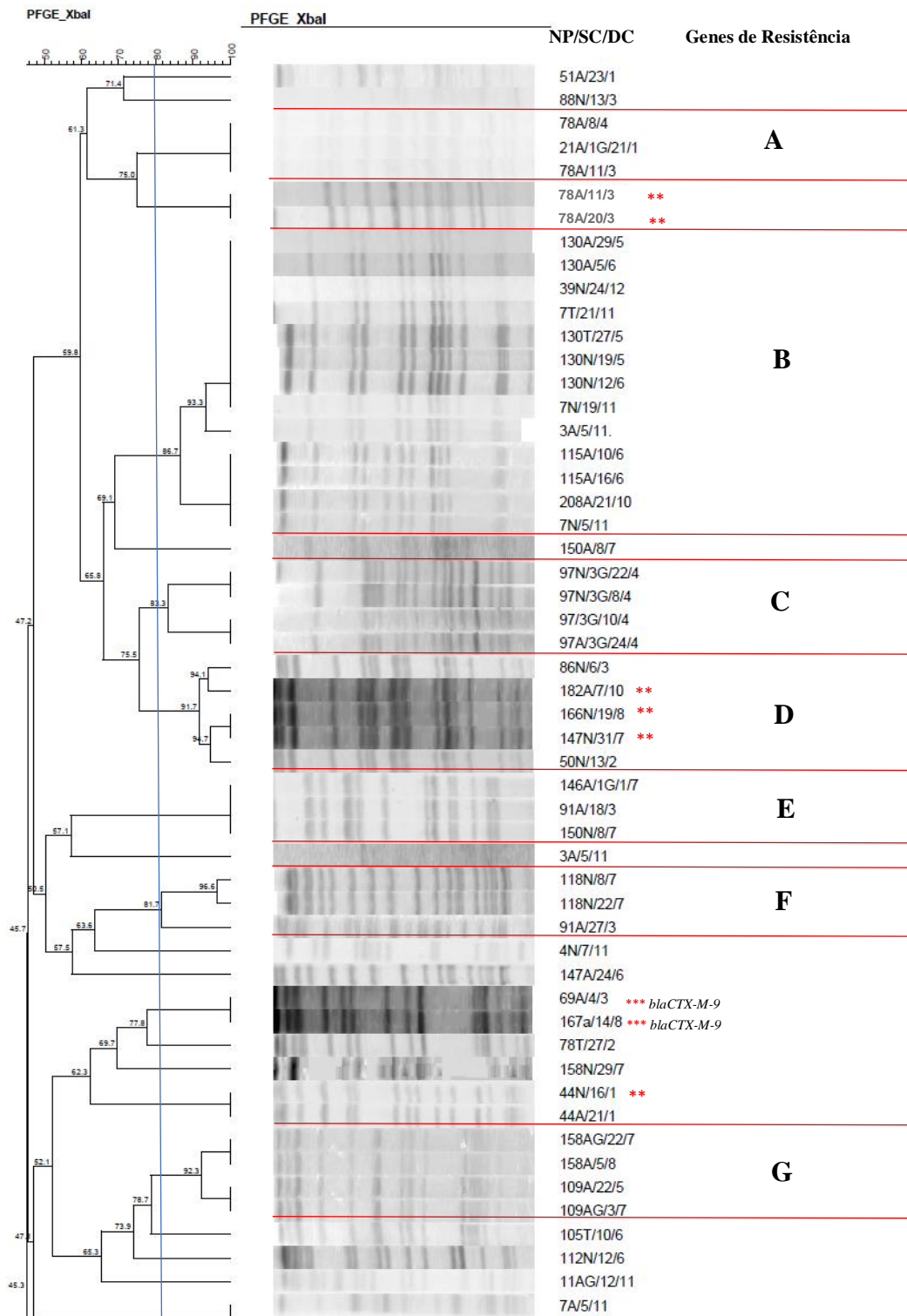
5.10 Perfil clonal dos isolados – Pulsed Field Gel Electrophoresis

Foram analisadas 186 enterobactérias pela técnica de PFGE. Destas, 70 (37,6%) correspondem a isolados de *Enterobacter cloacae*, 44 (23,5%) de *Serratia marcescens*, 33 (17,4%) de *Escherichia coli*, 14 (7,5%) de *Klebsiella aerogenes*, 11 (5,9%) de *Klebsiella oxytoca*, cinco (2,7%) de *Klebsiella pneumoniae*, quatro (2,1%) de *Citrobacter freundii*, três (1,6%) de *Proteus mirabilis* e dois (1,1%) de *Citrobacter diversus*. Dentre os Bacilos Gram-

negativos não fermentadores 16 foram submetidos à tipagem molecular, sendo 11 (68,7%) isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e 5 (31,3%) isolados de *Acinetobacter baumannii*.

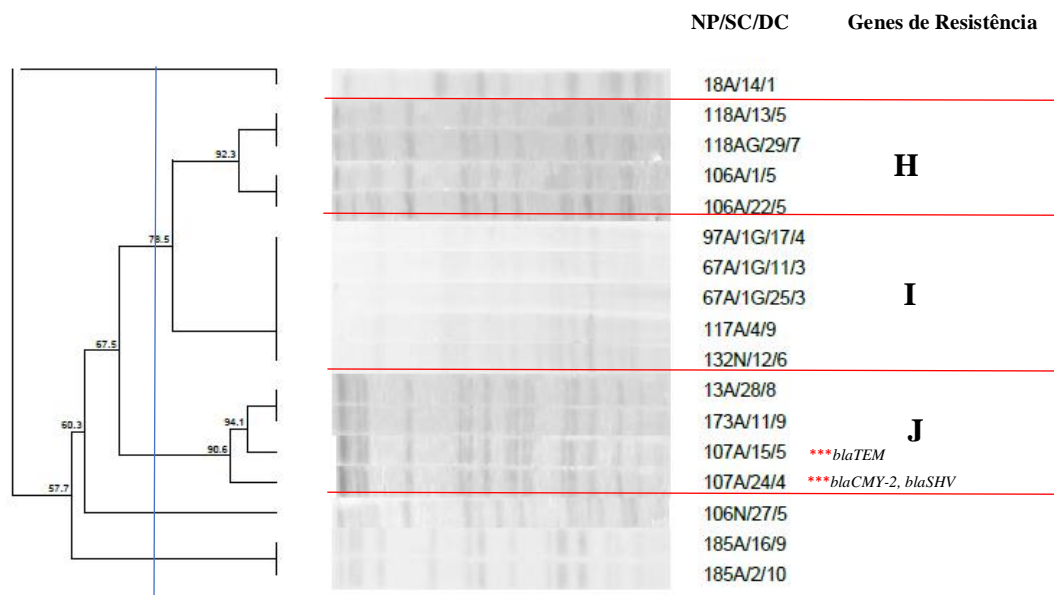
Na análise do perfil clonal de *Enterobacter cloacae* (**Figura 4**) foi possível observar a presença de dez clusters com similaridade $\geq 80\%$, que foram nomeados de A-J. No cluster B, com treze amostras, é possível observar a presença de isolados com perfis idênticos ou alta taxa de similaridade em diferentes RNs, o que demonstra uma possível transmissão entre eles. Também se observa a presença de isolados provenientes da mucosa nasal, anal e traqueal do mesmo neonato, evidenciando o fato do RN ser colonizado em sítios diferentes pela mesma linhagem, este fato também pode ser evidenciado no cluster C.

De forma semelhante aos dados citados acima, os *clusters* A, D, E, F, G, H, I e J demonstram a presença de isolados idênticos provenientes de RNs diferentes.



Nota: ** Amostras produtoras de ESBL pela técnica de disco aproximação, *** Isolados produtores de ESBL que apresentaram genes de resistência; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; T: traqueal.

Figura 4 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-*XbaI* de isolados de *Enterobacter cloacae* carregados por recém-nascidos.



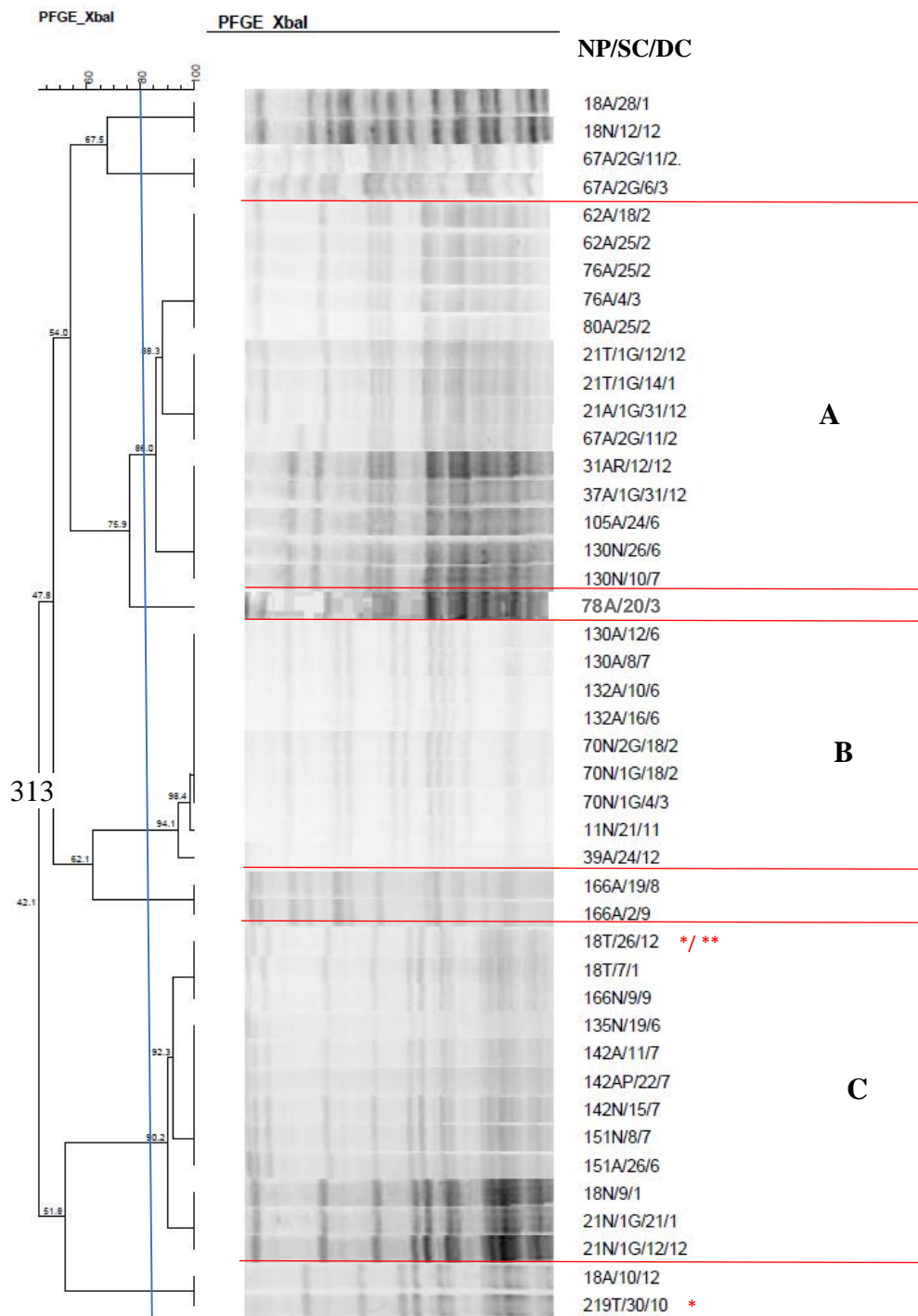
Nota: ** Amostras produtoras de ESBL pela técnica de disco aproximação, ***Isolados produtores de ESBL que apresentaram genes de resistência; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; T: traqueal.

Figura 4 - Continuação- Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-*XbaI* de isolados de *Enterobacter cloacae* carregados por recém-nascidos.

O dendrograma dos 44 isolados de *Serratia marcescens* (**Figura 5**) revelou três clusters identificados de A-C, com o agrupamento de nove a 14 isolados. No cluster A é possível observar o agrupamento de 14 isolados com alta taxa de similaridade em diferentes RNs, destes, dois (14,3%) foram isoladas da mucosa nasal, dois (14,3%) do aspirado traqueal e o restante da mucosa anal.

O cluster C, composto por 12 isolados revelou alta taxa de similaridade entre *Serratia marcescens* isoladas de diversos sítios e provenientes de diferentes neonatos, evidenciando a disseminação dessa linhagem na UTI neonatal. Esse cluster merece destaque pelo fato de uma amostra isolada de aspirado traqueal ter causado pneumonia nos RNs, demonstrando a capacidade de colonização e infecção deste micro-organismo.

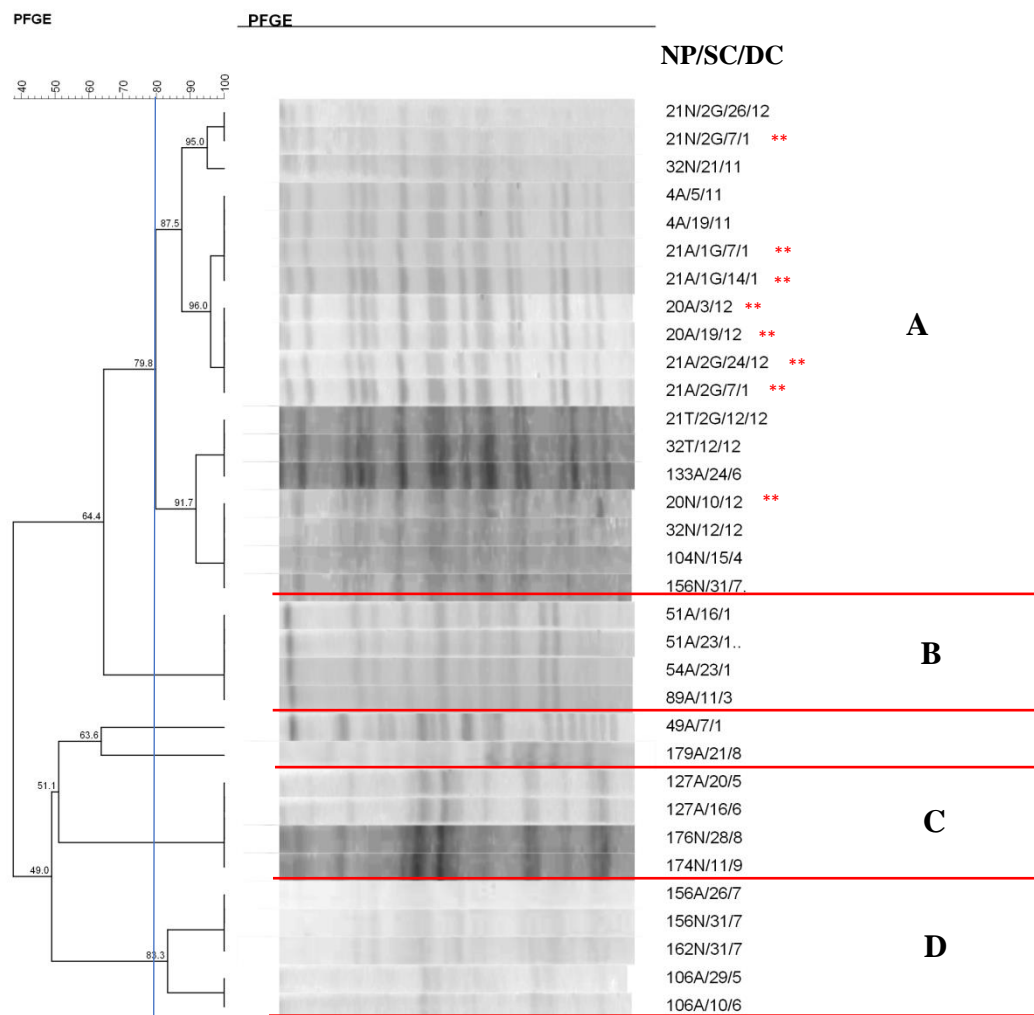
Vale ressaltar que dois isolados presentes neste dendrograma causaram pneumonia em RNs.



Nota: ** Amostras produtoras de AmpC pela técnica de disco aproximação ; * Isolado causador de infecção; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; T: traqueal; G: gemelar

Figura 5 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-XbaI de isolados de *Serratia marcescens* carregados por recém-nascidos.

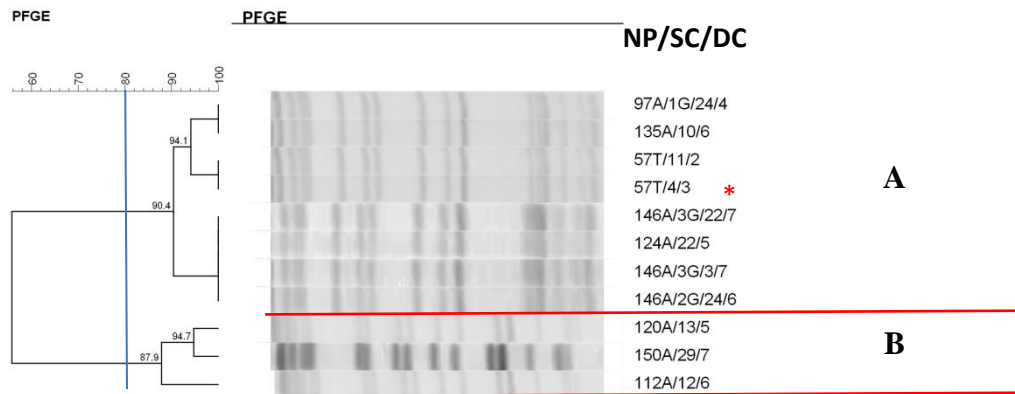
Em relação aos isolados de *Escherichia coli* (**Figura 6**) obteve-se a formação de quatro clusters, com o agrupamento de 18 isolados de diferentes RNs no cluster A, diversos isolados apresentando 100% de similaridade. Já nos clusters B, C e D é possível observar o agrupamento de isolados com 100% de similaridade colonizando neonatos distintos e isolados idênticos colonizando o mesmo RN em coletas diferentes.



Nota: ** Amostras produtoras de AmpC pela técnica de disco aproximação; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; T: traqueal; G: gemelar

Figura 6 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-*XbaI* de isolados de *Escherichia coli* carregados por recém-nascidos.

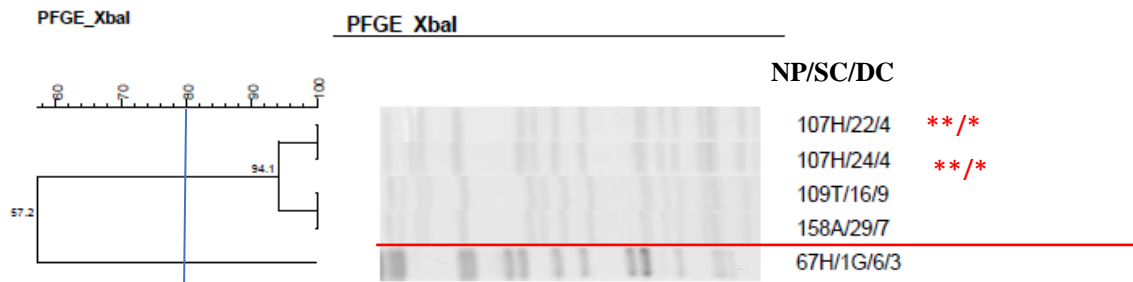
O dendrograma dos isolados de *Klebsiella oxytoca* (**Figura 7**) evidenciou a presença de dois clusters, no cluster A com oito isolados pôde ser constatado colonização e posterior infecção pelo mesmo micro-organismo. O cluster B apresentou isolados com alta taxa de similaridade colonizando RNs diferentes.



Nota: * Isolado causador de infecção; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; T: traqueal; G: gemelar

Figura 7 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-*Xba*I de isolados de *Klebsiella oxytoca* carreados por recém-nascidos.

O perfil clonal das amostras de *Klebsiella pneumoniae* (**Figura 8**) demonstrou a presença de um cluster com quatro isolados com alta taxa de similaridade (94,1%), destes dois foram obtidos de hemocultura, um da mucosa anal e um do aspirado traqueal (100% de similaridade) de RNs diferentes, portanto esta linhagem estava presente na UTI-neonatal colonizando ou infectando RNs diferentes, com destaque para a produção de ESBL nos isolados das hemoculturas.



Nota: * Isolados causadores de infecção; ** Amostras produtoras de ESBL pela técnica de disco aproximação; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; T: traqueal; G: gemelar

Figura 8 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-XbaI de isolados de *Klebsiella pneumoniae* carregados por recém-nascidos.

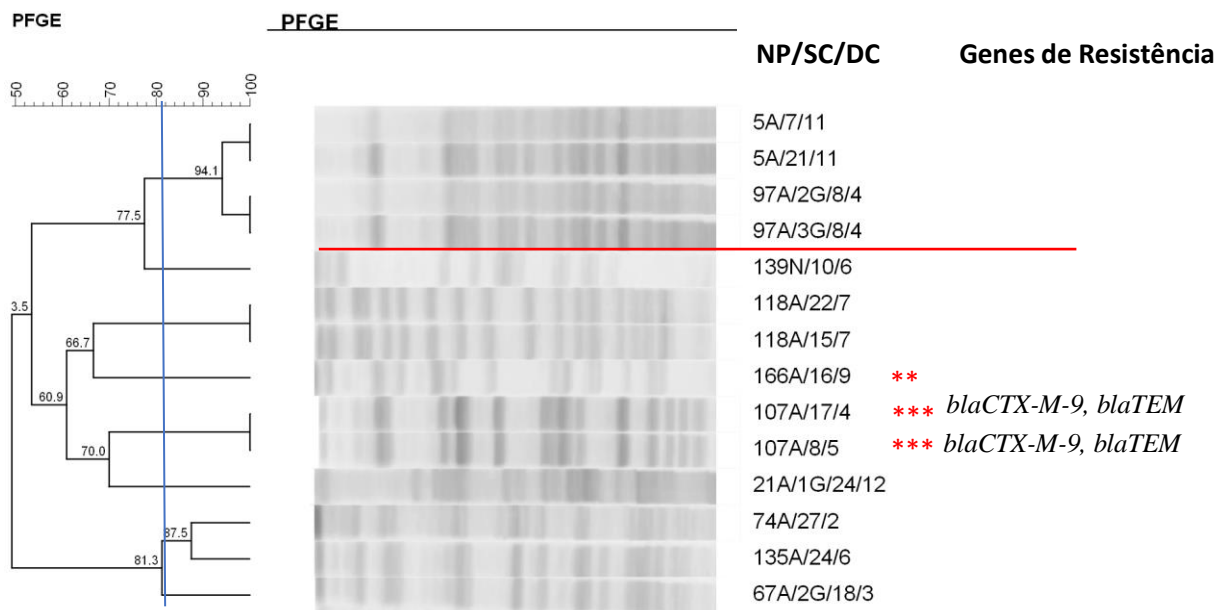
A análise dos três isolados de *Proteus mirabilis* (**Figura 9**) mostrou 100% de similaridade entre os isolados obtidos de colonização e infecção urinária de RNs diferentes.



Nota: * Isolado causador de infecção; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês);

Figura 9 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-XbaI de isolados de *Proteus mirabilis* carregados por recém-nascidos.

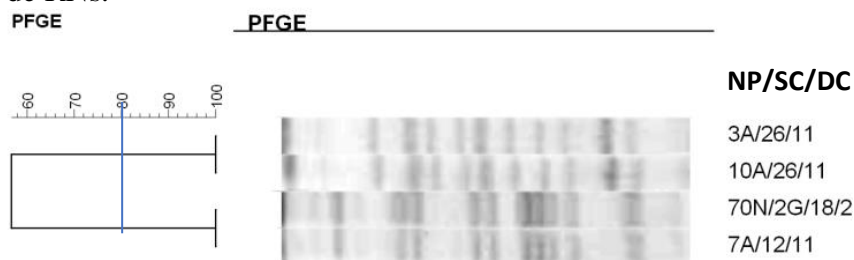
Na análise do perfil clonal dos isolados de *Klebsiella aerogenes* (**Figura 10**) pode ser observado um agrupamento de quatro isolados provenientes de dois RNs evidenciando 94,1% de similaridade.



Nota: ** Amostras produtoras de ESBL pela técnica de disco aproximação, *** Isolados produtores de ESBL que apresentaram genes de resistência; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; N: nasal; G: gemelar

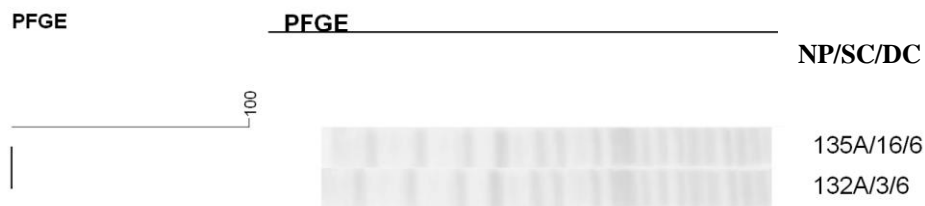
Figura 10 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-*Xba*I de isolados de *Klebsiella aerogenes* carreados por recém-nascidos.

Nos dendrogramas de *Citrobacter freundii* e *Citrobacter diversus* (**Figuras 11 e 12**) não foi possível observar a formação de clusters embora alguns isolados tenham apresentado alta similaridade, demonstrando uma maior variabilidade genética, com diferentes linhagens isoladas de RNs.



Nota: NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; N: nasal; G: gemelar

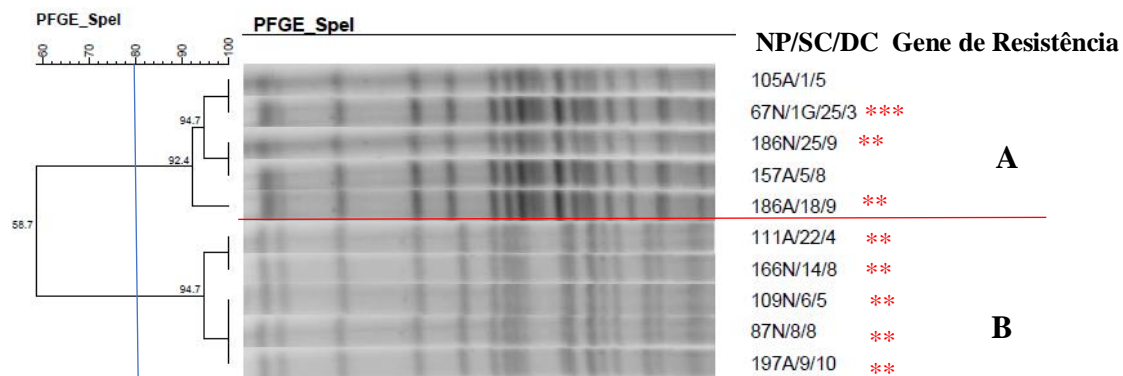
Figura 11 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-*Xba*I de isolados de *Citrobacter freundii* carreados por recém-nascidos.



Nota: NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal

Figura 12 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-XbaI de isolados de *Citrobacter diversus* carreados por recém-nascidos.

O perfil clonal das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 13**) demonstrou a presença de dois clusters com cinco isolados provenientes da colonização da MA e MN apresentando alta taxa de similaridade (92,4% e 94,7%). Em ambos os clusters pode ser evidenciado RNs diferentes colonizados pelo mesmo patógeno.



Nota: ** Amostras produtoras de AmpC pela técnica de disco aproximação; *** Isolado produtor de AmpC que apresentou gene de resistência; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; N: nasal; G: gemelar

Figura 13 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-Spel de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* carreados por recém-nascidos.

Na análise do perfil clonal dos isolados de *Acinetobacter baumannii* (**Figura 14**) pode ser observado dois agrupamentos de dois isolados provenientes de RNs diferentes. Vale

ressaltar que em um dos grupos pode ser evidenciado o mesmo patógeno presente na colonização traqueal e causando Infecção da corrente sanguínea em RNs.



Nota: * Isolado causador de infecção; NP: número do paciente; SC: sítio de coleta; DC: data da coleta (dia, mês); A: anal; N: Nasal; T: Traqueal; H: hemocultura

Figura 14 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,5% (Bionumerics Applied Maths) dos perfis PFGE-Spel de isolados de *Acinetobacter baumannii* carreados por recém-nascidos.

5.11 Análise dos fatores de risco

Empregou-se uma análise uni e multivariada de regressão de Cox para verificar os fatores de risco de colonização por micro-organismos Gram-negativos. Os resultados da análise multivariada revelaram que, a cada semana a mais na idade gestacional, aumenta o risco diário em 7,0% para a colonização do RN por bacilos Gram-negativos, enquanto o uso de antimicrobianos nas primeiras 72 horas, diminui o risco diário em 35% de colonização por esses patógenos (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Análise Uni e Multivariada (Regressão de Cox) para preditores de colonização por Enterobactérias e Bacilos Gram-negativos não fermentadores em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Preditores	Análise Univariada		Análise Multivariada	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Sexo Masculino	1,58 (1,03 – 2,43)	0,04		
Peso ao nascer (g x 100)	1,03 (1,01 – 1,05)	0,04		
Parto Cesáreo	0,076 (0,50 -1,14)	0,19		
Idade Gestacional (semanas)	1,08 (1,02 – 1,13)	0,003	1,07 (1,02 - 1,12)	0,007
Cateter Umbilical	0,69 (0,46 – 1,04)	0,07		
Cateter Central de Inserção Periférica (PICC)	0,73 (0,47 – 1,14)	0,17		
Intracath	1,24 (0,57 – 2,69)	0,58		
Acesso Venoso Periférico	1,22 (0,79 – 1,87)	0,38		
Nutrição Parenteral	0,78 (0,49 – 1,24)	0,29		
Cirurgia	0,89 (0,53 – 1,49)	0,66		
Ventilação Mecânica	0,59 (0,34 – 1,03)	0,06		
Uso de Antimicrobianos nas primeiras 72 horas***	0,61 (0,40 – 0,92)	0,02	0,65 (0,43 - 0,98)	0,04

HR: Hazard Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%.

***Penicilina, Ampicilina, Gentamicina

A análise multivariada para preditores de colonização por enterobactérias revelou que cada semana a mais na idade gestacional do neonato, aumenta o risco diário em 23% para colonização por Enterobactérias (**Tabela 11**).

Tabela 11- Análise uni e multivariada (Regressão de Cox) para preditores de colonização por Enterobactérias em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Preditores	Análise Univariada		Análise Multivariada	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Sexo Masculino	1,24 (0,81 – 1,91)	0,32		
Peso ao nascer (g x 100)	1,03 (1,00 – 1,06)	0,02		
Parto Cesáreo	0,097 (0,63 -1,50)	0,89		
Idade Gestacional (semanas)	1,08 (1,03 – 1,14)	0,002	1,23 (1,06 - 1,44)	0,008
Cateter Umbilical	0,075 (0,49 – 1,15)	0,19		
Cateter Central de Inserção Periférica (PICC)	0,68 (0,43 – 1,07)	0,1		
Intracath	1,16 (0,50 – 2,66)	0,73		
Acesso Venoso Periférico	1,11 (0,72 – 1,73)	0,64		
Nutrição Parenteral	0,69 (0,43 – 1,09)	0,11		
Cirurgia	0,93 (0,55 – 1,59)	0,79		
Ventilação Mecânica	0,55 (0,32 – 0,96)	0,04		
Uso de Antimicrobianos nas primeiras 72 horas***	0,65 (0,37 – 1,17)	0,15		

HR: Hazard Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%.

***Penicilina, Ampicilina, Gentamicina

A análise multivariada realizada para verificar os fatores de risco de colonização por Bacilos Gram-negativos não fermentadores, demonstrou que o uso de antimicrobianos nas primeiras 72 horas diminui em 72,0% o risco diário de colonização por bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (**Tabela 12**).

Tabela 12- Análise Uni e Multivariada (Regressão de Cox) para preditores de colonização por Bacilos Gram-negativos não fermentadores em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Preditores	Análise Univariada		Análise Multivariada	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Sexo Masculino	1,59 (0,49 – 5,15)	0,44		
Peso ao nascer (g x 100)	1,05 (0,098 – 1,12)	0,18		
Parto Cesáreo	0,55 (0,18 -1,66)	0,29		
Idade Gestacional (semanas)	1,09 (0,94 – 1,27)	0,27		
Cateter Umbilical	0,74 (0,24 – 2,26)	0,6		
Cateter Central de Inserção Periférica (PICC)	0,48 (0,15 – 1,57)	0,23		
Intracath	2,26 (0,29 – 17,93)	0,44		
Acesso Venoso Periférico	1,22 (0,37 – 3,99)	0,74		
Nutrição Parenteral	2,55 (0,33 – 19,62)	0,37		
Cirurgia	0,36 (0,05 – 2,78)	0,33		
Ventilação Mecânica	0,40 (0,08 – 1,99)	0,26		
Uso de Antimicrobianos nas primeiras 72 horas ***	0,34 (0,11 – 1,06)	0,06	0,28 (0,09 - 0,90)	0,03

HR: Hazard Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%.

***Penicilina, Ampicilina, Gentamicina

Na **Tabela 13** os resultados da análise multivariada demonstram que a produção de biofilme pelos bacilos Gram-negativos apresenta associação com a persistência da colonização do RN pelo mesmo patógeno, com aumento no risco diário de 3,68 vezes.

Tabela 13 - Análise Uni e Multivariada (Regressão de Cox) para preditores de persistência da colonização por Bacilos Gram-negativos em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Preditores	Análise Univariada		Análise Multivariada	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Sexo Masculino	0,77 (0,44 - 1,35)	0,37		
Peso ao nascer (g x 100)	1,01 (0,96 - 1,06)	0,73		
Parto Cesáreo	0,79 (0,45 - 1,40)	0,43		
Idade Gestacional (semanas)	0,98 (0,89 - 1,07)	0,68		
Cateter Umbilical	0,79 (0,45 - 1,39)	0,41		
Cateter Central de Inserção Periférica (PICC)	0,76 (0,35 - 1,63)	0,48		
Intracath	0,04 (0 - 6,92)	0,22		
Acesso Venoso Periférico	1,03 (0,58 - 1,83)	0,91		
Nutrição Parenteral	0,93 (0,43 - 1,98)	0,84		
Cirurgia	0,63 (0,28 - 1,42)	0,26		
Ventilação Mecânica	0,49 (0,22 - 1,05)	0,07		
Uso de Antimicrobianos nas primeiras 72 horas***	0,81 (0,47 - 1,41)	0,46		
Biofilme	3,29 (0,99 - 10,85)	0,051	3,68 (1,10 - 12,37)	0,04
ESBL	0,89 (0,12 - 6,55)	0,91		

HR: Hazard Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%.

***Penicilina, Ampicilina, Gentamicina

A análise multivariada para preditores de colonização por Enterobactérias e Bacilos Gram-negativos não fermentadores produtores de biofilme também mostrou que o uso de antimicrobianos nas primeiras 72 horas, diminui em 38% o risco diário do RN ser colonizado por esses micro-organismos produtores de biofilme (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Análise Uni e Multivariada (Regressão de Cox) para preditores de colonização por Enterobactérias e Bacilos Gram-negativos não fermentadores produtores de biofilme em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Preditores	Análise Univariada		Análise Multivariada	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Sexo Masculino	1,40 (0,90 – 2,16)	0,13		
Peso ao nascer (g x 100)	1,02 (0,99 – 1,04)	0,21		
Parto Cesáreo	0,85 (0,56 -1,30)	0,45		
Idade Gestacional (semanas)	1,06 (1,01 – 1,12)	0,02		
Cateter Umbilical	0,73 (0,48 – 1,12)	0,15		
Cateter Central de Inserção Periférica (PICC)	0,70 (0,44 – 1,09)	0,12		
Intracath	1,10 (0,51 – 2,39)	0,81		
Acesso Venoso Periférico	1,03 (0,11 – 1,58)	0,91		
Nutrição Parenteral	0,89 (0,55 – 1,42)	0,61		
Cirurgia	0,69 (0,40 – 1,19)	0,18		
Ventilação Mecânica	0,55 (0,31 – 0,95)	0,03		
Uso de Antimicrobianos nas primeiras 72 horas ***	0,58 (0,38 – 0,88)	0,01	0,62 (0,41 – 0,96)	0,03

HR: Hazard Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%.

***Penicilina, Ampicilina, Gentamicina

Empregou-se também uma análise uni e multivariada de regressão de Cox para verificar os fatores de risco de infecção por micro-organismos Gram-negativos. Os resultados da análise multivariada revelaram que a capacidade de produção de biofilme pelo micro-organismo aumenta a chance diária em 1,75 vezes (75%) para o neonato evoluir para infecção. Assim como a produção de ESBL por esses patógenos, que aumenta a chance diária de infecção em 46,8 vezes (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Análise uni e multivariada (Regressão de Cox) para preditores de infecção por Enterobactérias e Bacilos Gram-negativos não fermentadores em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Preditores	Análise Univariada		Análise Multivariada	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Sexo Masculino	0,59 (0,10 – 3,43)	0,56		
Peso ao nascer (g x 100)	0,81 (0,61 – 1,02)	0,16		
Parto Cesáreo	0,94 (0,16 – 5,63)	0,95		
Idade Gestacional (semanas)	0,80 (0,59 – 1,09)	0,16		
Cateter Umbilical	4,79 (0,55 – 42,06)	0,16		
Cateter Central de Inserção Periférica (PICC)	1,81 (0,21 – 15,84)	0,59		
Intracath	0,04 (0,00 – ...)	0,64		
Acesso Venoso Periférico	0,20 (0,04 – 1,13)	0,07		
Nutrição Parenteral	33,74 (0,01 – ...)	0,38		
Cirurgia	0,59 (0,07 – 5,25)	0,64		
Ventilação Mecânica	20,06 (0,00 – ...)	0,54		
Uso de Antimicrobianos nas primeiras 72 horas***	4,99 (0,58 – 43,39)	0,15		
Biofilme	1,69 (0,99 – 2,90)	0,053	1,75 (1,10 – 3,04)	0,048
ESBL	42,10 (3,80 – 463,13)	0,002	46,79 (4,18 – 523,72)	0,002

HR: Hazard Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%; ESBL: β -lactamases de espectro estendido

***Penicilina, Ampicilina, Gentamicina

6 DISCUSSÃO

Bactérias produtoras de ESBL representam um problema mundial, especialmente em países da América Latina e particularmente no Brasil, onde elevadas proporções de micro-organismos produtores de ESBL tem sido evidenciada.⁶²

Em decorrência da escassez de dados da literatura brasileira relacionados a população neonatal, este estudo foi realizado visando a obtenção de informações consistentes e representativas a respeito das características genotípicas e epidemiológicas de micro-organismos Gram-negativos isolados de colonização e infecção de neonatos pertencentes ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Durante o período do estudo 54,2% dos RNs foram colonizados e 3,3% foram infectados por micro-organismos Gram-negativos. Enterobactérias foram micro-organismos predominantemente isoladas dos sítios de colonização e infecção. Este trabalho demonstrou maior colonização da MA seguida pela MN. Nossos resultados apontam que *Enterobacter cloacae* foi a bactéria isolada com maior frequência em amostras colonizantes. Goldman et al.⁶³ ainda na década de 1970 observaram que 52,0% dos neonatos foram colonizados por este micro-organismo, esses mesmos resultados são compatíveis com os encontrados em 2019 por Baier et al.⁶⁴ e se assemelham aos encontrados no presente estudo (45,0%).

Os dados aqui encontrados revelaram maiores índices de infecção por *Klebsiella* spp. e *Serratia marcescens*, causando infecção da corrente sanguínea e pneumonia, respectivamente. Sabe-se que *K. pneumoniae* causa infecções nosocomiais em Neonatos prematuros e vários surtos foram relatados nos últimos anos.⁶⁵ Esse patógeno é altamente resistente a diversos agentes antimicrobianos, se relaciona etiológicamente a infecções oportunistas graves e surtos nosocomiais, se aloja na microbiota do trato gastrointestinal dos neonatos e, ultimamente, responde cada vez menos à terapia antimicrobiana em decorrência da existência de cepas produtoras de ESBL, a qual degrada um elevado número de antimicrobianos.⁶⁶ *Serratia marcescens* é um micro-organismo nosocomial importante, principalmente em UTIN, podendo ocasionar processos infecciosos graves englobando meningite, bacteremia e pneumonia, com associação significativa entre morbidade e mortalidade em neonatos.⁶⁷ Um estudo realizado em UTIN de um Hospital Universitário de Madrid para elucidar a frequência de colonização por *Serratia marcescens* em recém-nascidos demonstrou que 75% das crianças estavam colonizadas na mucosa anal por este micro-organismo.⁶⁸ Estes dados são compatíveis com os evidenciados neste trabalho que mostrou uma taxa de colonização da mucosa anal de 74,9%. Esta frequência de colonização elevada, juntamente com a imaturidade do sistema imunológico

de RNs e alteração da microbiota intestinal, predispõe ao desenvolvimento de infecções por estes patógenos.⁶⁹

Nesta pesquisa, pôde ser observada elevada produção de biofilme, sendo que 95,0% das enterobactérias e 100% dos BGNF foram produtores, com maior proporção de enterobactérias mostrando média produção de biofilme, enquanto os BGNF demonstraram em sua maioria serem fortes produtores. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta grande capacidade de produção de biofilme nas superfícies de dispositivos médicos,⁷⁰ incluindo superfícies metálicas, plásticos e superfícies bióticas, e tal fato prejudica a eliminação desses micro-organismos no ambiente hospitalar e dificulta o tratamento antimicrobiano, favorecendo o prolongamento das condições críticas do paciente.⁷¹ Um estudo realizado em quatro hospitais entre 2016 e 2017 com isolados provenientes de colonização e infecção revelou que *Pseudomonas aeruginosa* também apresenta maiores taxas de produção de biofilme quando comparado às enterobactérias.⁷² A prescrição do antimicrobiano adequado é fundamentada na concentração inibitória mínima (MIC) do fármaco para células planctônicas. Assim, a atividade dos antimicrobianos pode ser influenciada por diversos fatores, como o modo de crescimento bacteriano ou o ambiente. Usualmente, as células planctônicas são mais sensíveis aos agentes antimicrobianos do que na forma sésil em um biofilme, tornam-se resistentes ou tolerantes aos antibióticos, fenômeno designado "tolerância" fenotípica. No entanto, não totalmente compreensível, a tolerância ao biofilme é multifatorial e para biofilmes bacterianos, entende-se que esteja relacionada à diminuição da penetração de alguns antibióticos, sistemas relacionados a regulação da expressão gênica em resposta à densidade celular crítica (*quorum sensing*), troca mais acelerada de material genético e a presença de células persistentes.⁷³

Através da pesquisa dos genes que codificam fatores de virulência específicos para *Pseudomonas aeruginosa* foi possível observar que a maioria dos isolados apresentaram genes que codificam o alginato; associado à aderência bacteriana e produção de biofilme; fosfolipase C hemolítica, relacionada à destruição de membranas celulares e função osmoprotetora; exotoxina A, associada à destruição tecidual e inibição da resposta macrofágica; protease alcalina, relacionado à lesão tecidual e inativação da IgG; elastase, fator de degradação de imunoglobulinas e fatores do complemento e ramnolipídeos, agente surfactante e associado à aderência bacteriana.⁷⁴

Ao compararmos a virulência de *P. aeruginosa* isoladas de RNs com outros dados evidenciados em outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa com *P. aeruginosa* isoladas de peritonites em pacientes submetidos à diálise peritoneal foi possível observar resultados semelhantes. Outras evidências demonstram o mesmo perfil de virulência em *P.*

aeruginosa provenientes de pacientes com fibrose cística,⁸⁰ diferindo de isolados oriundos de infecções urinárias, água e solo,^{75,76} que evidenciam menor frequência desses genes de virulência. Um estudo realizado pela Universidade de Ciências Médicas de Tehran com crianças submetidas a tratamento intensivo também foi encontrado alta frequência de isolados de *P. aeruginosa* em amostras de urina carreando os genes *exoS* (92,95%), *lasB* (91,54%) e *plcH* (70,42%).⁷⁷

Quanto à produção de ESBL, o presente estudo demonstrou que 5,3 % dos patógenos isolados apresentaram produção fenotípica dessas enzimas. Vale ressaltar que a maior parte desses micro-organismos foram provenientes de sítios de colonização e compreendem espécies de *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes* e dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* que causaram infecção da corrente sanguínea. Os quatro isolados de *Klebsiella aerogenes* produtores de ESBL foram provenientes da mucosa anal, e entre os *Enterobacter cloacae*, sete foram oriundos da mucosa anal e três da mucosa nasal. Esses micro-organismos fazem parte da microbiota intestinal e podem se comportar como patógenos oportunistas causando infecções nosocomiais graves. Evidências apontam que *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL estão frequentemente envolvidos em surtos em UTIN apresentando potencial epidemiológico emergente.⁷⁸

As enterobactérias produtoras de ESBL merecem destaque pela rápida disseminação e o surgimento recorrente de novas variantes.⁷⁹ As enzimas pertencentes à família CTX-M são predominantes na América do Sul, assim como na Espanha e no Leste Europeu.⁸⁰ No Brasil, infere-se que variantes do tipo CTX-M sejam predominantemente encontradas quando comparadas às enzimas do tipo TEM e SHV, mais prevalentes na América do Norte e no Oeste Europeu, respectivamente.⁸¹ Dentro da família CTX-M, as ESBLs isoladas com maior frequência no Brasil incluem os grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9. Nossos achados são concordantes com esses dados, dentre os 16 (5,3%) isolados que produziram ESBL, seis apresentaram genes de resistência, destes, quatro (66,7%) apresentaram o gene codificador da enzima CTX-M do grupo 9, três (50%) apresentaram o gene de TEM e um (16,7%) foi positivo para o gene de SHV.

Portanto, neste estudo o tipo mais frequente de gene de ESBL foi o CTX-M do grupo 9. Um estudo multicêntrico realizado no estado do Rio de Janeiro revelou que essas taxas corresponderam a 87%. É possível que esta frequência elevada esteja relacionada a disseminação de plasmídeos codificadores de CTX-M situados em elementos genéticos móveis.⁸²

Um estudo realizado em Madagascar com RNs internados em UTIN revelou que todos os RNs com suspeita de infecção neonatal precoce foram tratados com ceftriaxona em decorrência da falta de carbapenêmicos e conseqüentemente houve uma elevação das taxas de mortalidade. Os patógenos envolvidos neste processo incluíram *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL, todas as cepas carregavam o gene CTX-M do grupo 15,⁸³ juntamente com nossas descobertas estas evidências reforçam a predominância da família CTX-M.

Diversos estudos apresentam diferentes taxas de colonização por micro-organismos multirresistentes. Por exemplo, Mammina et al.⁸⁴ evidenciaram uma taxa de 55,2% em RNs colonizados por micro-organismos Gram-negativos resistentes durante um estudo de coorte realizado em uma UTIN da Itália. Entretanto, Rybczmiska et al.⁸⁵ em uma pesquisa sobre colonização por enterobactérias produtoras de ESBL em uma unidade neonatal da Suécia revelou uma taxa de 1,77%. Tifhaet al.⁸⁶ estudando uma UTIN na Tunísia, revelou que esses valores se aproximam de 4,9% durante a hospitalização, aumentando para 7,84% no momento da alta. Nossos resultados evidenciam uma taxa de 5,3%.

O frequente isolamento de estirpes produtoras de ESBL e o risco de falha terapêutica pela administração de cefalosporinas têm conduzido ao maior uso de antibióticos carbapenêmicos.⁸⁷ Conseqüentemente, carbapenemases do tipo KPC-2, SPM-1, OXA-23, IMP-1 e OXA-143 têm se disseminado no país, especialmente em micro-organismos associados às IRAS.⁸⁸ Um resultado importante encontrado no presente estudo é a ausência de isolados produtores de carbapenemases, a UTIN em questão utiliza terapia antimicrobiana com carbapenêmicos apenas em casos esporádicos.

Além dessas enzimas, β -lactamases do Tipo AmpC estão relacionadas a resistência a uma variedade de antimicrobianos β -lactâmicos, exceto carbapenêmicos e cefepime.^{89,90} São clinicamente significativas pois apresentam capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (como ceftazidime, cefotaxime e ceftriaxona) e cefamicinas (cefexitina e cefotetan)^{91,92}. Elas diferem das ESBL por sua capacidade de hidrolisar cefamicinas e por não ser afetada por inibidores de β -lactamases.^{90, 91, 92} No presente estudo, o teste de sinergismo realizado para detecção de β -lactamases do Tipo AmpC demonstrou que 23 (6,6%) isolados produziram esta enzima, destes, dois apresentaram o genótipo EBC, sendo um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* e um de *Enterobacter cloacae*, outro isolado de *Enterobacter cloacae* carregava o gene *bla*CMY-2.

Um estudo realizado em um Hospital terciário da Índia com isolados de hemocultura evidenciou que β -lactamases do Tipo AmpC foram evidenciadas em 6,1% dos isolados.⁹³ Outra

pesquisa realizada em um hospital infantil no Paquistão revelou que esta taxa corresponde a 22,0%.⁹⁴ Outro estudo realizado em um hospital universitário para detecção de β -lactamases do Tipo AmpC em micro-organismos Gram-negativos isolados de diversos materiais clínicos para diagnóstico de infecção, revelou que esta frequência corresponde a 20,7%.⁹⁵

Infecções neonatais causadas por micro-organismos produtores de β -lactamases do Tipo AmpC proporciona falha no tratamento e elevação das taxas de morbidade e mortalidade. Para diminuir o risco de complicações é fundamental que o uso de cefalosporinas de amplo espectro seja restrito a fim de reduzir o surgimento de bactérias produtoras de AmpC.⁹⁴

A análise do perfil de macrorrestrrição do DNA cromossômico das enterobactérias provenientes de colonização e infecção dos RNs, permitiu identificar a característica de persistência e disseminação de algumas cepas dentro da unidade.

O perfil clonal de *Enterobacter cloacae* revelou a presença de dez clusters que foram nomeados de A-J. Em todos os clusters foi possível observar a presença de RNs diferentes com a mesma linhagem de *Enterobacter cloacae* em sítios distintos de colonização. O cluster J agrupou quatro isolados oriundos da mucosa anal, e um dos isolados foi produtor de ESBL no teste fenotípico e carregava o gene de TEM, outro isolado deste mesmo cluster carregava os genes de CMY-2 e de SHV. Em contrapartida, neste mesmo dendrograma foi verificado a presença dos genes *blaCTX-M* do grupo 9 em dois isolados com 100% de similaridade e obtidos de RNs diferentes. Um estudo realizado com crianças em um Centro de Emergência Pediátrica de Doha, Catar, investigou a presença de produção fenotípica de ESBL e de genes de resistência em enterobactérias isoladas de amostras de urina, os dados obtidos revelaram uma combinação de dois ou mais tipos de enzimas, que compreendem os genes *blaCTX-M*, *blaTEM* e *blaSHV*.⁹⁶ A maioria desses isolados (59%) apresentaram resistência devido ao gene *blaCTX-M*, esses fatos se assemelham aos resultados encontrados no presente estudo que evidenciou isolados carregando mais de um gene de resistência, como predominância do gene *blaCTX-M* do grupo 9. A presença do gene *blaCTX-M* nesta população sugere elevada capacidade de transmissão por plasmídeo, fato que contribui para transferência horizontal dos genes codificadores dessas enzimas. Atualmente, os serviços de saúde apresentam alta rotatividade de pacientes favorecendo esta disseminação.⁹⁷

Vale ressaltar que no cluster D em que houve o agrupamento de cinco amostras de *Enterobacter cloacae* isolados de fevereiro à outubro, de diferentes RNs, foi verificada a detecção fenotípica de ESBL em três isolados de *Enterobacter cloacae* que agruparam com alta taxa de similaridade, revelando ser a mesma linhagem que possivelmente adquiriu essa resistência durante sua permanência na UTIN. Uma pesquisa realizada com isolados de

Enterobacter spp. obtidos de diferentes pacientes internados em três hospitais de ensino revelou que dos 30 isolados que demonstraram produção fenotípica de ESBL, 27 apresentaram os genes de resistência *blaCTX-M*, *blaTEM* e *blaSHV*.⁹⁸ Em uma pesquisa realizada por Kanamori et al.⁹⁹ no Japão, 11 de 22 amostras produtoras apresentaram tais genes.

A análise do perfil clonal de *Serratia marcescens* revelou a formação de três clusters, todos demonstrando a transmissão cruzada de micro-organismos. No cluster C, foi verificado a presença de RNs diferentes com isolados idênticos ou alta taxa de similaridade, colonizando e causando pneumonia em RNs. A linhagem associada com infecção apresentou forte produção de biofilme. Tal patógeno é comumente encontrado em hospitais causando infecções. Apresenta elevada capacidade de aderência em dispositivos médicos em decorrência da produção de biofilme favorecendo o desenvolvimento de processos infecciosos. Um estudo realizado em uma UTIN do México com isolados de sangue, pontas do cateter, líquido peritoneal, líquido pleural e abscesso abdominal demonstrou transmissão cruzada entre pacientes em UTIN e outras enfermarias. Duas linhagens distintas foram responsáveis por dois surtos, a investigação ambiental não conseguiu identificar uma fonte de *Serratia marcescens* de superfícies, água, soluções, sistema de ventilação, estetoscópios ou mãos da equipe. A contaminação transitória das mãos dos profissionais de saúde foi evidenciada como fator importante na transmissão. Acredita-se que a transferência dos RNs da UTIN para as enfermarias possa ter contribuído para a disseminação dentro do hospital.¹⁰⁰

O perfil clonal de *Escherichia coli* demonstrou a formação de quatro clusters. No cluster A foi possível observar o agrupamento de 18 isolados colonizando diferentes sítios de um mesmo neonato e de RNs distintos, a maior parte das amostras apresentaram 100% de similaridade. Outro dado importante deste cluster está relacionado a produção de β -lactamases do Tipo AmpC, vários isolados com perfis idênticos produziram esta enzima fenotipicamente. Vale ressaltar que no período de aproximadamente oito meses esta mesma cepa colonizou cinco RNs em diferentes sítios demonstrando sua característica de persistência na UTIN. Outro fato importante neste cluster é a presença de RNs gêmeos sendo colonizados pelo mesmo micro-organismo. *Escherichia coli* é usualmente um comensal inofensivo do trato gastrointestinal humano.¹⁰¹ Entretanto existem algumas cepas altamente virulentas capazes de causar infecções intestinais, do trato urinário, meningite, infecção intra-abdominal, pneumonia, infecção de dispositivos intravasculares, osteomielite e bacteremia.^{102,103} É um dos principais micro-organismos presentes no trato genital materno em decorrência da proximidade entre a região anal e perineal, e a colonização vaginal por este micro-organismo pode ser detectada em 7% a

13% das gestantes.^{104,105} Um estudo realizado na Clínica de Obstetrícia e Ginecologia e Clínica de Neonatologia do Hospital da Universidade Lituana de Ciências da Saúde revelou que a capacidade de transmissão da mãe para o bebê correspondem a 21,3%.¹⁰⁶ Outros estudos revelam que esta taxa corresponde a 50%.^{107,108}

Através da análise do perfil clonal de *Klebsiella aerogenes* foi possível observar formação de um cluster, com quatro isolados provenientes de dois RNs diferentes evidenciando 94,1% de similaridade. Entre os 14 isolados submetidos à tipagem, quatro produziram ESBL fenotipicamente, destes, duas amostras provenientes de um mesmo RN coletadas em datas diferentes carregavam os genes CTX-M do grupo 9 e o gene TEM e apresentaram 100% de similaridade. As ESBLs nesta espécie representam um grande problema em decorrência da potencial transmissão de genes de resistência a outras espécies bacterianas, e também pelo fato da maioria das ESBLs serem codificadas por plasmídeos que também transportam genes que conferem resistência a outros antimicrobianos não β -lactâmicos, como os aminoglicosídeos.¹⁰⁹ Um estudo realizado com a população pediátrica do Hospital de Vara, localizado no Oeste da Bulgária revelou predominância da enzima CTX-M do grupo 3 presentes em clones de *Klebsiella aerogenes* detectados em duas epidemias. Esta descoberta é semelhante com os dados encontrados nesta pesquisa e com outras investigações que encontram clones de *Klebsiella aerogenes* portadores da enzima CTX-M. Um outro estudo, realizado por Ghanavati et al. demonstrou que *blaCTX-M* e *blaTEM* foram os genes de resistências mais comuns encontrados nesta espécie.⁹⁸

Nos isolados de *Klebsiella oxytoca* foi observado a formação de dois clusters, o cluster A, evidenciou amostras provenientes de colonização anal e isolado do aspirado traqueal associado também com pneumonia. Vale ressaltar que o isolado causador de infecção apresentou forte produção de biofilme. *Klebsiella oxytoca* é um patógeno oportunista que causa frequentemente pneumonia, bacteremia, infecções do trato urinário e enterocolite.^{110,111} Uma pesquisa realizada no Japão realizou análise do perfil genético destes micro-organismos envolvidos em um surto com duração de um ano e seis meses e também revelou isolados idênticos, o que indica que o surto foi causado pela mesma linhagem.¹¹²

O perfil genético de *Klebsiella pneumoniae* demonstrou a presença de um cluster contendo isolados de colonização e isolados de hemocultura associados com infecção da corrente sanguínea. Estas amostras apresentaram produção fenotípica de ESBL e forte produção de biofilme. Uma pesquisa realizada com materiais clínicos coletados de pacientes internados em UTIN, UTI Pediátrica, Adulto e Coronariana, no Sul do Chile através da análise do perfil

genético também demonstrou alta taxa de similaridade entre os isolados, além disso pôde ser constatada amostras produtoras de ESBL fenotipicamente com ausência de genes de resistência.¹¹³ *Klebsiella pneumoniae* é frequentemente isolada em ambientes destinados a prestação de cuidados, colonizando e causando infecções do trato respiratório, sepse e infecções do trato urinário.^{114,115} Um dos seus principais fatores de virulência incluem a produção de biofilme, favorecendo o processo de aderência a dispositivos médicos e dificultando o tratamento dos processos infecciosos, através de suas interações fisiológicas e genéticas.¹¹⁶

Os isolados de *Proteus mirabilis* submetidos a análise do perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico revelou 100% de similaridade em isolados de colonização anal e infecção do trato urinário provenientes de RNs diferentes. Isolados de colonização e infecção apresentaram média produção de biofilme. *Proteus mirabilis* causa infecções sintomáticas do trato urinário, incluindo cistite e pielonefrite e está presente em casos de bacteriúria assintomática, apresenta alguns fatores de virulência envolvidos neste processo, dentre eles a capacidade de produzir biofilme.^{117,118}

O perfil clonal dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou a presença de dois clusters com cinco isolados provenientes de colonização da MA e MN com alta taxa de similaridade. Em ambos os clusters pôde ser evidenciado RNs diferentes colonizados pelo mesmo patógeno, como também podemos perceber a característica de persistência destas cepas dentro da UTIN, colonizando RNs durante grande parte do estudo. A maioria dos isolados evidenciados no dendrograma produziram β -lactamases do Tipo AmpC fenotipicamente. *Pseudomonas aeruginosa* é um micro-organismo responsável por uma ampla variedade de infecções em UTIN, incluindo sepse, pneumonia, meningite, diarreia, conjuntivite e infecções de pele.¹¹⁹ A transmissão deste patógeno está frequentemente associada a reservatórios ambientais e as mãos dos profissionais de saúde,^{120, 121, 122,123}. Durante uma epidemia de 15 meses que aconteceu em uma UTIN de um hospital infantil pôde ser evidenciado a presença de três clusters formados por isolados de infecção da corrente sanguínea, colonização traqueal, ambiente e mãos de profissionais de saúde.¹²² Foca et al.¹²⁴ em um estudo realizado em uma UTIN de um hospital universitário de Nova York também demonstraram um clone principal com isolados provenientes de materiais clínicos de RNs, profissionais de saúde e ambiente. Outro estudo realizado por um período de 24 meses em uma UTIN da Itália com amostras de colonização e infecção de RNs revelou que 36% das infecções e 35% da colonização foram causadas pelo mesmo patógeno, com o mesmo perfil genético também evidenciado no ambiente.¹²⁵

Apesar do perfil policlonal apresentado por *Acinetobacter baumannii*, pôde ser observado dois agrupamentos de dois isolados provenientes de RNs diferentes. Vale ressaltar que em um dos grupos ele estava presente na colonização traqueal e como agente de infecção da corrente sanguínea. Com o passar dos anos, *Acinetobacter baumannii* tornou-se uma das principais causas de surtos nosocomiais. A utilização de tratamento com antibióticos de amplo espectro de ação, procedimentos invasivos como tubo endotraqueais, cateteres intravenosos e cateteres urinários favorecem a colonização e infecção por estes patógenos.^{126,127}

Em um surto que ocorreu durante seis meses em uma UTIN indiana, *Acinetobacter* spp. foram isolados de bacias e cateteres intravenosos.¹²⁸ Uma pesquisa realizada em Taiwan, demonstrou que este micro-organismo está sendo transmitido possivelmente através das mãos dos profissionais de saúde.¹²⁹ Dados de um estudo realizado em uma UTIN da Turquia revelaram através da técnica de PFGE que as mesmas cepas isoladas dos dispositivos invasivos e amostras clínicas também estavam evidentes nas mãos dos profissionais de saúde, afirmando a hipótese de que o ambiente pode ter sido o potencial reservatório e que, possivelmente a transmissão ocorreu através das mãos dos profissionais.¹³⁰ No presente estudo, isolados similares de *Acinetobacter baumannii* permaneceram dentro da unidade colonizando e infectando RNs por um período de 71 dias. A higienização das mãos continua sendo fator preponderante na prevenção de infecções em UTIN.¹³⁰

Empregou-se uma análise uni e multivariada de regressão de Cox para verificar os fatores de risco de colonização e infecção por micro-organismos Gram-negativos. Os resultados da análise multivariada para colonização por bacilos Gram-negativos revelaram que, a cada semana a mais na idade gestacional, aumenta o risco diário em 7,0% para a colonização do RN, enquanto o uso de antimicrobianos nas primeiras 72 horas, diminui o risco diário em 35% de colonização por esses patógenos. A análise multivariada para determinação dos fatores de risco para colonização por enterobactérias também mostrou a idade gestacional como fator de risco, aumentando o risco diário em 23% a cada semana a mais na idade gestacional do RN. Este dado pode ser explicado pelo fato dos RNs prematuros serem colonizados predominantemente por micro-organismos Gram-positivos,¹³¹ em especial os *Staphylococcus* spp., membros da microbiota normal da pele que colonizam o RN nos primeiros dias de vida, e podem ocasionar inúmeros processos infecciosos que se manifestam com diversas sintomatologias clínicas, englobando patologias localizadas até quadro sistêmico.^{132,133,134}

Quanto ao uso de antimicrobianos nas primeiras 72 horas, a análise multivariada dos fatores de risco para colonização por micro-organismos Gram-negativos não fermentadores de glicose, também mostra uma redução diária de 72% no risco de colonização por esses micro-

organismos. Além desses resultados, outra análise multivariada mostra que a antibioticoterapia prévia diminui 38% o risco diário do RN ser colonizado por micro-organismos Gram-negativos produtores de biofilme. Outros autores também detectaram que os antibióticos diminuem a diversidade microbiana, porém enfatizaram que este fato pode não apresentar relevância clínica.^{135,136,137,138} Posteriormente ao nascimento, os RNs são expostos a colonização de superfícies mucosas, este processo varia de acordo com o tipo de parto, dieta e exposição ao meio ambiente.^{139,140,141} A prescrição de antibióticos de forma precoce aumenta o risco de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, em especial micro-organismos Gram-negativos produtores de ESBL, através da pressão seletiva, oferecendo vantagens para a expressão de genes de resistência pela bactéria.¹⁴²

A produção de biofilme também apresentou associação com a persistência da colonização do RN pelo mesmo patógeno, com aumento no risco diário de 3,68 vezes. A matriz do biofilme apresenta fator preponderante relacionado a esta persistência.^{143,144} Alguns componentes estão presentes nesta matriz, como proteínas, polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos e variam de acordo com as condições ambientais e com os micro-organismos produtores de biofilme.¹⁴⁵ Algumas bactérias também segregam fatores de virulência que eliminam micro-organismos competidores, favorecendo o crescimento das bactérias do biofilme, destruindo a concorrência para utilização de nutrientes.¹⁴⁶ Na presença de biofilme as bactérias sesséis também se comportam de forma mais eficaz aos desafios, como por exemplo a terapia antimicrobiana, favorecendo a persistência da colonização.^{147,148}

Empregou-se também uma análise uni e multivariada de regressão de Cox para verificar os fatores de risco de infecção por micro-organismos Gram-negativos. Os resultados da análise multivariada revelaram que a capacidade de produção de biofilme pelo micro-organismo aumenta a chance diária em 1,75 vezes (75%) para o neonato evoluir para infecção. Sabe-se que o biofilme é a causa de grandes proporções de infecções nosocomiais.¹⁴⁹ Esse aumento na chance de evoluir para infecção pode estar relacionado à resistência aos antimicrobianos¹⁵⁰ que ocorre pela diminuição da penetração do antibiótico pela matriz do biofilme, modificação da taxa de crescimento dos patógenos que o compõe,¹⁵¹ bem com alterações fisiológicas, incluindo a expressão de possíveis genes de resistência.¹⁵² As infecções ocasionadas por micro-organismos com capacidade de produzir biofilme são frequentemente difíceis de erradicar, transformando-se em infecções recorrentes,^{153,154} se tornando um problema extremamente grave especialmente na população neonatal que apresenta debilidade do sistema imunológico e exposição frequente a diversos procedimentos invasivos. Diversos estudos compararam a proporção de mortes de bactérias em suspensão e em biofilme, sendo que as produtoras de

biofilme apresentaram taxa de resistência elevada a diversos antimicrobianos.^{155,156}

Assim como o biofilme, no presente estudo a produção de ESBL também aumentou a chance diária em 46,8 vezes para o RN evoluir para infecção. As IRAS causadas por microorganismos produtores de ESBL é uma preocupação crescente em UTIN e estão frequentemente associadas a surtos hospitalares.¹⁵⁷ Estudos demonstram que tempo de internação dos RNs está frequentemente associado ao desenvolvimento de infecções por bactérias produtoras de ESBL, bem como a imaturidade do sistema imunológico, utilização frequente de dispositivos invasivos e o ambiente.^{158, 159} Além disso, o uso empírico de antimicrobianos podem favorecer a pressão seletiva e conseqüentemente elevar as taxas de colonização e infecção por microorganismos produtores de ESBL.¹⁶⁰

Os dados desta pesquisa são de fundamental importância para saúde pública, pois permitem o conhecimento da epidemiologia molecular de espécies importantes de enterobactérias na UTIN de um hospital universitário terciário de alta complexidade, permitindo assim a intensificação do monitoramento e implantação de medidas de controle e precaução.

O conhecimento dos mecanismos de resistência aplicados, associados ao rápido diagnóstico laboratorial de cepas multirresistentes é fundamental para escolha da antibioticoterapia adequada e conseqüente controle da disseminação da resistência bacteriana.

As evidências aqui demonstradas reforçam a importância das ações de vigilância, prevenção e controle das IRAS em UTINs, fornecendo diretrizes para elaboração de novos protocolos novas abordagens a equipe multidisciplinar, contribuindo para redução das taxas de morbidade e mortalidade visando uma melhor qualidade da assistência prestada a população neonatal.

7 CONCLUSÃO

- Apesar da alta frequência de isolamento de colonização de RNs por Enterobactérias, poucos RNs apresentaram infecção, com maior frequência de colonização por *Enterobacter cloacae* e infecção por *Klebsiella* spp. e *Serratia marcescens*.
- Produção elevada de biofilme com maior proporção de enterobactérias mostrando média produção de biofilme, enquanto os BGNF demonstraram em sua maioria serem fortes produtores.
- Alta frequência de genes que codificam fatores de patogenicidade em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Predominância de *Enterobacter* spp. isolados de colonização e *Klebsiella* spp. isoladas de infecção, produtores de ESBL, e maior frequência do gene *blaCTX-M* do grupo 9, seguido de *blaTEM* e *blaSHV*.
- Detecção de *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de β -lactamases do Tipo AmpC, carreando o genótipo EBC.
- Ausência de enterobactérias e BGNF produtores de carbapenemases.
- Evidências de linhagens idênticas de enterobactérias em diferentes sítios de RNs distintos, demonstrando possível transmissão cruzada e identificação da persistência de algumas linhagens de enterobactérias na UTIN.
- Aumento do risco diário de colonização por micro-organismos Gram-negativos a cada semana a mais na idade gestacional e redução do risco diário de colonização por micro-organismos Gram-negativos com a utilização de terapia antimicrobiana nas primeiras 72 horas.
- A produção de biofilme pelo micro-organismo aumenta o risco diário de persistência de colonização do RN pelo mesmo patógeno.
- A capacidade de produção de biofilme e ESBL pelo micro-organismo aumenta a chance diária do RN evoluir para infecção.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance. [2018].
2. Ting JY, Panguette V, Ng K, Lisonkova S, Hait V, Shivanada S, et al. Reduction of inappropriate antimicrobial prescriptions in a tertiary neonatal intensive care unit after antimicrobial stewardship care bundle implementation. *Pediatr Infect Dis J* 2019;38:54–59.
3. Kallen MC, Natsch S, Opmeer BC, Hulscher MEJL, Schouten JA, Prins JM, et al. How to measure quantitative antibiotic use in order to support antimicrobial stewardship in acute care hospitals: a retrospective observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:347–355.
4. Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasil.
5. Goldman DA. The bacterial flora of neonates in intensive care monitoring and manipulation. *J Hosp Infect.* 1988;11:340-51.
6. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1996;17:47-52.
7. Mussi-Pinhata MM, Nascimento SD. Neonatal nosocomial infections. *Pediatr (Rio J).* 2001;7:81-S96.
8. Stoll BJ. The global impact of neonatal infection. *Clin Perinatol* 1997; 24:1-21.
- 9) Silva GHS. Análise clínica e laboratorial da sepse com hemocultura positiva em recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal durante 5 anos. [dissertação] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2007.
10. Gerios L. Sepse tardia em prematuros de muito baixo peso: experiência de um centro universitário terciário. [dissertação] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2018.
11. Mullett MD, Cook EF, Gallagher R. Nosocomial sepsis in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol* 1998;18:112-5.
12. Asensio A, Oliver A, Gonzalez-Diego P, Baquero F, Perez-Diaz JC, Ros P, et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Disease* 2000;30:55-60.
13. Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, et al. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1481-1491.

14. Vijayakanthi N, Bahl D, Kaur N, Maria A, Dubey NK. Frequency and characteristics of infections caused by extended-spectrum betalactamase-producing organisms in neonates: a prospective cohort study. *Biomed Res Int* 2013;2013:756209.
15. Guzmán-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis* 2014;18:421-433.
16. Kristóf K, Szabó D, Marsh JW, Cser V, Janik L, Rozgonyi F. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:563-570.
17. Nelson-Filho P, Borba IG, Mesquita KSF, Silva RAB, Queiroz AM, Silva LAB. Dynamics of microbial colonization of the oral cavity in newborns. *Braz Dent J* 2013; 24:415-419.
18. Domingo CP, Georgel P, Bahram S. Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools. *HLA* 2016;87:133-140.
19. Fu W, Foster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010;54:397-404.
20. Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Biswas R, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol* 2016;306:48-58.
21. Harper D, Parracho HMRT, Walker J, Sharp R, Hughes G, Werthén M, et al. Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* 2014;3:270-284.
22. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634-640.
23. Simpson JA, Smith SE, Dean RT. Alginate inhibition of the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages. *J Gen Microbiol* 1988;134:29-36.
24. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J. Mol Sci* 2013;14:20983-21005.
25. Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals* 2014;42:1-7.
26. Caixeta DS. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por suas espécies de *Pseudomonas* em superfície de ácido inoxidável. Dissertação (Mestrado em microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras – Lavras; 2008.
27. Flach J, Karnop C, Corção, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com o leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinarie* 2005;33:291-96.

28. Del Pozzo JL, Rouse MS, Patel R. Bioelectric effect and bacterial biofilms: a systematic review. *Int J Artif Organs* 2008;31(9):786 – 9.
29. Tavares W. (2002). *Manual de antimicrobianos e quimioterápicos antinfeciosos*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1216 p.
30. McGowan JJ. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control* 2006;34:S29-S37.
31. Livemore D.M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol* 1995;8:557-584.
32. Depardieu T, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulation of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol* 2007;20:79-114.
33. Winn WC, Koneman E. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 6 The Enterobacteriaceae; 2006.
34. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann, Rossolini GM, Arlet G, et al. Woodford, N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob. Chemother* 2007;59:165-174.
35. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997;24:S19-45.
36. Silva CHPM. Extended-Spectrum Beta-Lactamase: definitions, clinical relevance and laboratorial detection. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 2000;32(3):215-219.
37. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151-61.
38. MONTEIRO J, SANTOS AF, ASENSI MD *et al.* First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:333-34.
39. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, Abdoulaye S, Omar A, Bercion R, et al. Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant Enterobacteria, Senegal. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17:143-4.
40. Pinto FM. Prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. *Clin Biomed Res* 2014; 34:47-52.
41. Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, Van Boven CPA: Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol* 2000;38: 2488-93.
42. Cookson BD, Aparicio P, Deplano A, Strulens M, Goering R, Marples R. Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1996;44:179–184.

43. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:47-52.
44. ANVISA. Diagnóstico e prevenção de Iras em Neonatologia. Brasília, 2011.
45. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006;44(8):2974-6.
46. Stumpf AN, Roggenkamp A, Hoffmann H. Specificity of enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction for the detection of clonality the *Enterobacter cloacae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53(1):9-16.
47. Thong KL, Lai MY, The CSJ, Chua KH. Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR. *Tropical Biomedicine* 2011;28(1): 21-31.
48. Jeong ES, Kyoung-Sun LEE, Seung-Ho HEO, Jin-Hee SEO, Yang-Kyu CHOI. Triplex PCR for the simultaneous detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter hepaticus* and *Salmonella typhimurium*. *Exp Anim* 2011;60(1):65-70.
49. Polson SW, Higgins JL, Woodley CM. PCR-based Assay for detection of four coral pathogens. Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium, Ft. Lauderdale, Florida 2008;7(11):247-51.
50. Belas R, Schneider R, Melch M. Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: identification of rsbA encoding a regulator of swarming behavior. *J Bacteriol* 1998;80(23):6126-39.
51. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković *et al.* Quantification of biofilm in microtiterplates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS* 2007;115:891-899.
52. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broadspectrum-lactamases conferring transferable resistance to newer -lactam agents in enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases* 1988;10:867-878.
53. Livermore. Interpretative Reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 48(Suppl S1) 87-102, 2001.
54. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: Interpretando a antibiograma. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.
55. ANVISA. Nota Técnica Nº 01/2013 Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multiresistentes. Brasília, 2013.
56. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol* 2004;53:73-81.

57. Fernandes SA, Camargo CH, Francisco GR, Bueno MFC, Garcia DO et al. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamases CTX-M-8 and CTX-M-2-Producing Salmonella Serotypes from Clinical and Nonhuman Isolates in Brazil. *Microb Drug Resist* 2017;23:580–589.
58. Manoharan A, Sugumar M, Kumar A, Jose H, Mathai D. Phenotypic & molecular characterization of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. & *Enterobacter* spp. from five Indian Medical Centers. *Indian J Med Res* 2012;135(3):359 – 364.
59. Poirell, NaasT, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:24–38.
60. Priyadarshini Shanmugam, JeyaMeenakshisundaram, Perumal Jayaraman. *bla_{KPC}* gene Detection in Clinical Isolates of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2013;7(12): 2736-2738.
61. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L. Establishment of a universal size standard strain for use with thePulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the National databases to the new size standard. *J Clin Microbiol* 2005;43:1045–1050.
62. Seki LM. Caracterização genética em cepas da família Enterobacteriaceae isoladas de hemocultura de um hospital do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade Fundação Oswaldo Cruz; 2012.
63. Goldman D, Leclair J, Macone A. Bacterial colonization of neonatesadmitted to an intensive care environment. *J Pediatr*1978;93:288-93.
64. Baier C, Ziesing S, Ebadi E, Hansen G, Bohnhorst B, Bange FC. Prospective surveillance of bacterial colonization andprimary sepsis: findings of a tertiary neonatal intensive and intermediate care unit. *Journal of Hospital Infection* 2019;102:325-33.
65. Artelt T, Kaase M, Bley I, Eiffert H, Mellmann A, Helmut K, et al. Transmission risk on a neonatal intensive care unit: *Escherichia coli* versus *Klebsiella pneumoniae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2018;2018:1525072.
66. Correa L, Martino MD, Siqueira I, Pasternak J, Gales AC, Silva CV, et al. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *BMC Infect Dis* 2013;13(80):1-8.
67. Berthelot P, Grattard F, Amerger C et al. Investigation of a nosocomial outbreak due to *Serratia marcescens* in a maternity hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*1999; 20:233–6.
68. Moles L, Gómes M, Moroder E, Jiménez E, Escuder D, Bustos G, et al. *Serratia marcescens* colonization in preterm neonates during their neonatal intensive care unit stay. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2019;8:135.
69. Montagnani C, Cocchi P, Lega L, Campana S, Biermann KP, Braggion C, et al. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: crucial role ofimplementing hand hygiene among external consultants. *BMC Infect Dis* 2015;15(1):1–5.

70. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–93.
71. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc* 2018;81:7–11.
72. Cepas V, López Y, Munoz E, Rolo D, Ardanuy C, Marti S, et al. Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microbial Drug Resistance* 2019;25:1.
73. Costerton JW. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:711–45.
74. Bernardini J, Piraino B, Sorkin M. Analysis of continuous ambulatory peritoneal dialysis-related *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Am J Med* 1987;83:829–32.
75. Lanotte P, Watt S, Mereghetti, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol* 2004;53:73-81.
76. Badamchi A, Masoumi H, Javadinia S, Asgarin R, Tabatabaee A. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. *Microb Pathog* 2017;107:44-47.
77. Heidary Z, Eshagh B, Eftekhary M, Jafari AA. Virulence Genes Profile of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Iranian Children with UTIs. *Acta Med Iran* 2016;54(3):201-210.
78. Maerken TV, Brabandere ED, Noel A, Coorevits L, Waegemaeker P, Ablorh R, et al. A recurrent and transesophageal echocardiography-associated outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex in cardiac surgery patients. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2019;8:152.
79. Silva KCS, Lincopan N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. *J Bras Patol Med Lab* 2012;48(2)91-99.
80. Villegas MV, Blanco MG, Osornio JS, Rossi F et al. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America: 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Braz J Infect Dis* 2011;15(1):34-9.
81. Minarini LAR, Clímaco EC, Guimarães DB, Ferreira JC. Clonal transmission of ESBL producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 2008;56(6):587-91.
82. Andrade L, Minarini LAR, Clímaco EC, Silva AP N. Determinants of β -lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. *Can J Microbiol* 2010;56(5)399-407.
83. Naas T, Cuzon G, Robinson AL, Adrianirina Z, Imbert P, Ratsima E, et al. Neonatal infections with multidrug-resistant ESBL-producing *E. cloacae* and *K. pneumoniae* in Neonatal Units of two different Hospitals in Antananarivo, Madagascar. *BMC Infectious Diseases* 2016;16:275.

84. Mammina C, Di Carlo P, Cipolla D, Giuffre M, Casuccio A, Di Gaetano V, et al. Surveillance of multidrug-resistant Gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. *Am J Infect Control* 2007;35(4):222-30.
85. Johansson H, Lundberg F. Efficacy of a once-a-week screening programme to control extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in a neonatal intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 2014;46(6):426-32.
86. Tffifha M, Ferjani A, Mallouli M, Mlika N, Abroug S, Boukadida J. Carriage of multidrug-resistant bacteria among pediatric patients before and during their hospitalization in a tertiary pediatric unit in Tunisia. *Libyan J Med* 2018;13(1):1419047.
87. Picão RC, Poirel L. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(5):2225-6, 2009.
88. Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamisuka EM. High prevalence of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):1322-3.
89. Odeh R, Kelkar S, Hujer AM, Bonomo RA, Schreckenberger PC, Quinn JP. Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2002;35:140-5.
90. Manchanda V, Singh NP. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. *J Antimicrob Chemother* 2003;5: 415-8.
91. Bush K., Jacoby G.A. & Medeiros A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995; 39:1211-1233;
92. Santiago GS, Motta CC, Bronzato GF, Gonçalves D, Souza MMS, Coelho IS, Irene da Silva, et al. Revisão: Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. *Rev. Bras. Med Vet* 2016;38(Supl.3):17-30.
93. Chelliah A, Ravinder T, Katragadda R, Leela KV, Babu RN. Isolation of MRSA, ESBL and AmpC – β -lactamases from Neonatal Sepsis at a Tertiary Care Hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014;8(6):DC24-DC27.
94. Salamat S, Ejaz H, Zafar A, Javed H. Detection of AmpC β -lactamase producing bacteria isolated in neonatal sepsis. *Pak J MedSci* 2016;32(6):1512-1516.
95. Manchanda V, Singh NP, Shamweel A, Eideh HK, Thukral SS. Molecular epidemiology of clinical isolates of AmpC producing *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J Med Microbiol* 2006;24(3):177-181.
96. Eltai NO, Thani AAA, Al-Ansari K, Deshmukh AS, Wehedy E, Al-Hadidi SH, et al. Molecular characterization of extended spectrum β -lactamases enterobacteriaceae causing

lower urinary tract infection among pediatric population. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2018;7:90.

97. Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):1946–55.

98. Ghanavati R, Emaneini M, Neyestanaki DK, Maraji AS, Dalvand M, Beigverdi R. Clonal relation and antimicrobial resistance pattern of extended-spectrum β -lactamase- and AmpC β -lactamase producing *Enterobacter* spp. isolated from different clinical samples in Tehran, Iran. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018;51(1):88-93.

99. Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Hirotsu A, Arai K, Endo S, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamases and qnr determinants in *Enterobacter* species from Japan. *PLoS One* 2012;7(6):e37967.

100. Miranda G, Kelly C, Solorzano F, Leanos B, Coria R, Patterson JE. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing To Study an Outbreak of Infection Due to *Serratia marcescens* in a Neonatal Intensive Care Unit Guadalupe. *Journal of clinical microbiology* 1996;34(12):3138–3141.

101. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 2000; 181:1753–1754.

102. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:123–140.

103. Gransden WR, Eykyn SJ, Phillips I, Rowe B. Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes. *Rev Infect Dis* 1990; 12:1008–1018.

104. Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A. Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol* 2004; 104:1062-76.

105. Friedman S, Shah V, Ohlsson A, Matlow AG. Neonatal *Escherichia coli* infections: concerns regarding resistance to current therapy. *Acta Paediatr* 2000;89:686-9.

106. Tameliene R, Barcaite E, Stoniene D, Buinauskiene J, Markuniene E, Kudreviciene A. *Escherichia coli* Colonization in Neonates: Prevalence, Perinatal Transmission, Antimicrobial Susceptibility, and Risk Factors. *Medicina (Kaunas)* 2012;48(2):71-6.

107. Amstey MS, Lewin E, Colaice J. Vaginal colonization with invasive *Escherichia coli* during pregnancy. *Am J ObstetGynecol* 1980;137(5):534-5.

108. Asindi A, Archibong E, Mannan NB. Mother-infant colonization and neonatal sepsis in prelabor rupture of membranes. *Saudi Med J* 2002;23(10):1270-4.

109. Neuwirth C. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum β -lactamase to other members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1996; 34:76–79.

110. Högenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe IT. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated haemorrhagic colitis. *N Engl J Med* 2006;355:2418–2426.
111. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11: 589–603.
112. Fujita A, Kimura K, Yokoyama S, Jin W, Wachino J, Yamada K. Characterization of Piperacillin/Tazobactam Resistant *Klebsiella oxytoca* Recovered from a Nosocomial Outbreak. *Plos One* 2015; 0142366.
113. Pavez M, Troncoso C, Osses I, Salazar R, Illiesca V, Reydet P, et al. High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing enterobacteriaceae infection in intensive care units in southern Chile. *Braz j infect dis* 2019;23(2):102–110.
114. Podschun R, Pietsch S, Holler C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(7):3325–7.
115. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Igbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011;15(4):305-11.
116. Aghaei SS, Keykha M, Karami M, Rahdar H. Evaluation and Identification of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hospitalized Patients in Qom City,(Iran). *Qom Univ Med Sci J* 2019;13(4):39-47.
117. Matthews SJ, Lancaster JW. Urinary tract infections in the elderly population. *Am J Geriatr Pharmacother* 2011; 9:286–309.
118. Papazafiropoulou A, Daniil I, Sotiropoulos A, Balampani E, Kokolaki A, Bousboulas S, et al. Prevalence of asymptomatic bacteriuria in type 2 diabetic subjects with and without microalbuminuria. *BMC Res Notes* 2010; 3:169.
119. Gupta AK, Shashi S, Mohan M, Lamba IM, Gupta R: Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a neonatal intensive care unit. *J Trop Pediatr* 1993; 39:32-36.
120. Muyltermans G, de Smet F, Pierard D, Steensseen L, Stevens D, Bougateg A, Lauwers S: Neonatal infections with *Pseudomonas aeruginosa*. associated with a water-bath used to thaw fresh frozen plasma. *J Hosp Infect* 1998; 39:309-314.
121. Gras-Le Guen C, Lepelletier D, Debillon T, Gournay V, Espaze E, Roze JC: Contamination of a milk bank pasteuriser causing a *Pseudomonas aeruginosa*. outbreak in a neonatal intensive care unit. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F434-435.
122. Moolenaar RL, Crutcher JM, San Joaquin VH, Sewell LV, Hutwagner LC, Carson LA, Robison DA, Smithee LM, Jarvis WR: A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:80-85.
123. Zawacki A, O'Rourke E, Potter-Bynoe G, Macone A, Harbarth S, Goldmann D: An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and bloodstream infection associated with

intermittent otitis externa in a healthcare worker. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:1083-1089.

124. Foca M, Jacob K, Whittier S, Della Latta P, Factor S, Rubenstein D, Saiman L: Endemic *Pseudomonas aeruginosa* infection in a neonatal intensive care unit. *New Engl J Med* 2000;343:695-700.

125. Crivaro V, Popolo AD, Caprio A, Lambiase A, Resta MD, Borriello T, et al. Open Access Research article *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. *BMC Infectious Diseases* 2009;9:(70).

126. Regev R, Dolfen T, Zelig I, Givoni S, Wolach B. *Acinetobacter* septicemia: a threat to neonates? Special aspects in a neonatal intensive care unit *Infection* 1993;21:394–6.

127. Presterl E, Nadrchal R, Winkler S, Makristathis A, Koller W, Rotter ML, Hirschl AM. Molecular typing of *Acinetobacter baumannii* from ten different intensive care units of a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:740–3.

128. Mittal N, Nair D, Gupta N, Kabra S, Kumar S, Prakash SK, Sharma VK. Outbreak of *Acinetobacter* spp septicemia in a neonatal ICU. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003;34:365–6.

129. Huang YC, Su LH, Wu TL, Leu HS, Hsieh WS, Chang TM, et al. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a neonatal intensive care unit: clinical implications and genotyping analysis. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:1105–9.

130. Hosoglu S, Hascuhadar M, Yasar E, Uslu S, Aldudak B. Control of an *Acinetobacter baumannii* outbreak in a neonatal ICU without suspension of service: a devastating outbreak in Diyarbakir, Turkey. *Infection* 2012; 40:11–18.

131. Barbosa TA. Epidemiologia da colonização e infecção microbiana em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: abordagem clínica e molecular. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Universidade Estadual Paulista; 2016.

132. Silva ECBF, Samico TM, Cardoso RR, Rabelo MA, Bezerra-Neto AM et al. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. *Rev Esc Enferm USP* 2012;46(1):132-7.

133. Smith TC, Forshey BM, Hanson BM, Wardyn SE, Moritz ED. Molecular and epidemiologic predictors of *Staphylococcus aureus* colonization site in a population with limited nosocomial exposure. *Am J Infect Control* 2012;30:1-5.

134. Edwards AM, Massey RC, Clarke SR. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Mol Oral Microb* 2012;27: 1-10.

135. Fouhy F, Guinane CM, Hussey S et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56: 5811–20.

136. Greenwood C, Morrow AL, Lagomarcino AJ. Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of *Enterobacter*. *J Pediatr* 2014; 165: 23–9. 43.
137. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, Jumas-Bilak E, et al. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 2011; 158: 390–6.
138. Zhou Y, Shan G, Sodergren E et al. Longitudinal analysis of the premature infant intestinal microbiome prior to necrotizing enterocolitis: a case-control study. *PLoS One* 2015; 10: e0118632.
139. Azad MB, Konya T, Persaud RR, Guuttman DS, Chari RS, Field CJ, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breast feeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG* 2016;123: 983–93.
140. Hartz LE, Bradshaw W, Brandon DH. Potential NICU environmental influences on the neonate's microbiome: a systematic review. *Adv Neonatal Care* 2015;15:324–35.
141. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;1: 4578–85.
142. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74:417–33.
143. Mah T, O'Toole G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9, 34-39. 2001.
144. Richards JJ, Melander C. Controlling Bacterial Biofilms. *Chem Bio Chem* 2009;10(14):2287-94.
145. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;13(1):20-6.
146. Kohler T, Donner V, van Delden C. Lipopolysaccharide as shield and receptor for R-pyocin-mediated killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2010;192(7):1921-8
147. Kohler T, Guanella R, Carlet J, Van Delden C. Quorum sensing-dependent virulence during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation and pneumonia in mechanically ventilated patients. *Thorax* 2010 August;65(8):703-10.
148. Jayaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* 2008;10:145-67.
149. Bryers JD, Ratner BD. Bioinspired implant material befuddle bacteria. *ASM News* 2004;70:232-7.

150. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):999-1007.
151. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001;9(1):34-9.
152. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):167-93.
153. Bryers JD. Medical biofilms. *BiotechnolBioeng* 2008;100(1):1-18.
154. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318-22.
155. De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration in to biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(12):4339-44.
156. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG Investigation of ciprofloxacin penetration in to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(9):2125-33.
157. Desta K, Woldeamanuel Y, Azazh A, Mohammad H, Desalegn D, Shimelis D, et al. High Gastrointestinal Colonization Rate with Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Hospitalized Patients: Emergence of Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae* in Ethiopia. *PloS one* 2016;11:e0161685.
158. Brady MT. Health care-associated infections in the neonatal intensive care unit. *American journal of infection control* 2005;33:268-75.
159. Sarvikivi E, Lyytikainen O, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Luukkainen P, Tarkka E, et al. Clustering of *Serratia marcescens* infections in a neonatal intensive care unit. *Infection control and hospital epidemiology* 2004;25:723-9.
160. Murki S, Jonnala S, Mohammed F, Reddy A. Restriction of cephalosporins and control of extended spectrum beta-lactamase producing gram negative bacteria in a neonatal intensive care unit. *Indian pediatrics* 2010;47:785-8.

ANEXOS

ANEXO A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: a ser assinado em duas vias, uma, para o sujeito, e, outra, para o pesquisador.

Você está sendo convidado a colaborar com o projeto de pesquisa chamado “Incidência de colonização e infecção por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.” Leia atentamente o texto abaixo e faça qualquer pergunta que achar necessário. Texto: A necessidade de um recém-nascido permanecer em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), mais o contato com a mãe no momento do nascimento, ou da amamentação, ou com os profissionais de saúde representam fatores que podem levar a criança a ter determinadas bactérias no corpo. Essas bactérias podem conseguir ou não provocar infecção no bebê, sendo que crianças que precisam ficar por mais tempo em uma UTIN apresentam riscos maiores de ter infecção. O objetivo da nossa pesquisa é identificar quais bactérias que os bebês carregam.

Para isso, precisamos colher secreção traqueal (quando o bebê estiver intubado), nasal e anal e realizar exames. A coleta da secreção traqueal se faz através da aspiração, sendo esta um procedimento de rotina da UTIN, a coleta nasal e anal é realizada por meio de uma espécie de “cotonete”. Isso é feito de forma suave e não causa dor, pode causar apenas um rápido desconforto. Na secreção colhida, serão feitos exames para identificar quais bactérias estão presentes. Também serão realizados exames para identificar a possibilidade de essa bactéria causar doença. Você ficará sabendo do resultado através do pesquisador, que entrará em contato com a equipe médica da UTIN. Além disso, participando da pesquisa, você irá colaborar com o conhecimento sobre as bactérias, e sua distribuição em meio aos recém-nascidos, possibilitando um melhor cuidado aos bebês, através medidas de prevenção e tratamento de infecções. É importante você saber que em nenhum momento será divulgado seu nome ou qualquer informação que permita a identificação de seu filho (a). Além disso, você poderá retirar sua participação da pesquisa quando quiser, bastando para isso entrar em contato com o pesquisador, e, se não se sentir atendido, com o Chefe do Departamento de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Quaisquer outras dúvidas podem ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Fone: 14-3880 1608 ou 1609). Este documento deve ser assinado em duas vias, uma das quais ficará com você e, a outra, com os pesquisadores do projeto.

Declaro que li o texto acima e concordo em participar do projeto de pesquisa.

Ass.: _____ Nome: _____

Assinatura do Pesquisador : _____

Thaís Alves Barbosa

ANEXO B: Questionário de coleta de dados clínicos

Data da coleta: ___/___/___ Data da Admissão: ___/___/___ Data da alta: ___/___/___

Nome:.....RG:.....Data do nascimento: ___/___/___

Sexo: (...) M (...) F Peso ao nascer:..... Peso atual:.....

Idade por ocasião da cultura:.....

Tipo de parto:.....Idade gestacional (IG) no parto:.....

Ruptura prolongada de membrana (> 24 horas):.....

Pontuação do Apgar no 5º minuto:.....

Procedência da criança:.....Duração da hospitalização (dias):.....

Internação na UTI:.....Duração(dias):.....

Data da cateterização:.....Duração (dias):.....

Cateterização: (...) Arterial (...) Venosa

Tipo de cateter:

(...) Umbilical

(...) Flebotomia

(...) PICC

(...) Intracath

(...) Outros.....

Data da remoção do cateter:

Causas da remoção do cateter:

(...) Infecçiosa

(...) Suspeita de infecção

(...) Mecânica (Obstrução, translocação, sangramentos)

(...) Outras.....

Nutrição parenteral: (...) SIM (...) NÃO

Ventilação mecânica: (...) SIM (...) NÃO

Procedimentos cirúrgicos: (...) SIM (...) NÃO

Demais procedimentos invasivos:.....

Diálise peritoneal: (...) SIM (...) NÃO

Antibioticoterapia prévia: (...) SIM (...) NÃO

Amamentação predominante: (...) SIM (...) NÃO

Doença de base:.....

Dados laboratoriais

Hemograma:

Leucocitose: (...) SIM (...) NÃO

Leucopenia: (...) SIM (...) NÃO

Neutropenia: (...) SIM (...) NÃO

Neutrofilia: (...) SIM (...) NÃO

Plaquetopenia: (...) SIM (...) NÃO

Desvio á esquerda: (...) SIM (...) NÃO

Proteína C Reativa (PCR):.....

Culturas de materiais clínicos:.....

Antibiograma:.....

Outros:.....

Óbito: (...) SIM (...) NÃO

Data do óbito:.....

ANEXO C: Escore Hematológico

Na tentativa de melhorar a acurácia diagnóstica, RODWELL et al. desenvolveram um escore hematológico, que considera um ponto para cada uma das seguintes características:

- Leucocitose ou leucopenia (considerar leucocitose ≥ 25.000 ao nascimento ou ≥ 30.000 entre 12 e 24 horas ou acima de $21.000 \geq 48$ horas. Considerar leucopenia ≤ 5.000) • Neutrofilia ou neutropenia;
- Elevação de neutrófilos imaturos;
- Índice neutrofílico aumentado;
- Razão dos neutrófilos imaturos sobre os segmentados $\geq 0,3$;
- Alterações degenerativas nos neutrófilos com vacuolização e granulação tóxica;
- Plaquetopenia ($< 150.000/\text{mm}^3$).

Um escore ≥ 3 oferece sensibilidade de 96,0% e especificidade de 78%, e um escore de 0, 1 ou 2 fornece valor preditivo negativo de 99,0%. Embora útil, não se constituiu isoladamente ainda em um teste definitivo para diagnóstico de sepse, uma vez que não identifica todos os neonatos sépticos.

Quadro 3. Valores de neutrófilos (por mm³) em Recém-nascidos

	Neutropenia	Neutrofilia	Neutrófilos		Imaturos	
	PN < 1,5 Kg*	PN > 1,5Kg	PN < 1,5 Kg*	PN > 1,5 Kg	Imaturos*	Totais*
Nascimento	< 500	< 1800	> 6300	> 5400	> 1100	> 0,16
12 horas	< 1800	< 7800	> 12400	> 14500	> 1500	> 0,16
24 horas	< 2200	< 7000	> 14000	>12600	> 1280	> 0,16
36 horas	< 1800	< 5400	> 11600	>10600	> 1100	> 0,15
48 horas	< 1100	< 3600	> 9000	> 8500	> 850	> 0,13
60 horas	< 1100	<3000	> 6000	> 7200	> 600	> 0,13
72 horas	< 1100	< 1800	> 6000	> 7000	> 550	> 0,13
120 horas	< 1100	< 1800	> 6000	> 5400	> 500	> 0,12
4° ao 28° d	< 1 100	< 1800	> 6000	> 5400	> 500	> 0,12

Manroe et al., 1979; *Mouzinho et al., 1994.