



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELISANGELA DE FÁTIMA GOBO

**COLONIZAÇÃO POR MICRORGANISMOS DO GRUPO
"ESKAPE" EM RECÉM-NASCIDOS HOSPITALIZADOS EM
UNIDADES NEONATAIS EM UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO**

Londrina
2020

ELISANGELA DE FÁTIMA GOBO

**COLONIZAÇÃO POR MICRORGANISMOS DO GRUPO
"ESKAPE" EM RECÉM-NASCIDOS HOSPITALIZADOS EM
UNIDADES NEONATAIS EM UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini.

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

GOBO, ELISANGELA DE FÁTIMA.

COLONIZAÇÃO POR MICRORGANISMOS DO GRUPO "ESKAPE" EM RECÉM-NASCIDOS HOSPITALIZADOS EM UNIDADES NEONATAIS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO / ELISANGELA DE FÁTIMA GOBO. - Londrina, 2021.
81 f. : il.

Orientador: Márcia Regina Eches Perugini.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Multirresistência - Tese. 2. Recém Nascidos - Tese. 3. Bacilos Gram Negativos - Tese. 4. Colonização - Tese. I. Perugini, Márcia Regina Eches. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 616-092

ELISANGELA DE FÁTIMA GOBO

**COLONIZAÇÃO POR MICRORGANISMOS DO GRUPO
"ESKAPE" EM RECÉM-NASCIDOS HOSPITALIZADOS EM
UNIDADES NEONATAIS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gilselena Kerbauy Lopes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de dezembro de 2020.

Dedico este trabalho a meu esposo e filhas por estarem presentes em todos os momentos. Dedico a minha orientadora, por todos os ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela infinita bondade de nos dar a vida e cuidar dela, mesmo quando nós não cuidamos.

A Nossa Senhora Mãe de Jesus e por ser a Nossa Mãe e nos carregar no colo.

Agradeço a minha Mãe Thereza “in memorian”, que não viu aqui na terra me tornar adulto, mas sei que lá do céu, acompanhou todos meus passos e olhou por eles.

À meu esposo Leandro, não tenho palavras de agradecimento, pois você faz parte de mim e todas as minhas conquistas são suas também, na alegria, na tristeza, na saúde e na doença, são esses votos que prevalecem sempre.

À minhas filhas, Isabela Thereza e Anna Clara, melhor parte de mim, minha realização, minha vida em flores, minha sustentação para todos os dias, meu orgulho, meus amores.

Minha irmã Eliza, um pouco de mãe, sempre ao meu lado, nos momentos em que mais precisei, minha conselheira, minha amiga.

A minha querida orientadora professora Dra. Marcia Regina, exemplo de competência, sabedoria, postura e amizade, pessoa humana. Meu muito obrigado pela confiança, por estar presente, pelos ensinamentos científicos e para a vida, por todas as conversas, pelas cobranças necessárias, terás sempre meu respeito e admiração.

Aos colegas e amigos do programa de Mestrado, aos orientandos da Professora Marcia Regina, dos laboratórios de microbiologia, CCIH, Biomol por estarem presentes e fazer parte desse projeto, cada um direta e indiretamente foi essencial para essa conclusão, obrigada pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pelo companheirismo. Não preciso citar nomes, pois cada um sabe o quão importantes foram para essa conquista.

Fabio, Gerusa, exemplos de sabedoria e pessoas, estiveram presentes durante meu aprendizado. Muito obrigada.

Alisson, Natalia, Gabriela, Tilara, Josi, Luis Felipe, Fernanda, Leonardo, Luana, vocês foram fundamentais para o andamento dos resultados. Muito obrigada.

João Gabriel, Vanessa, Felipe, Raquel, sem vocês a análise molecular seria muito mais difícil.

Tiago, muito obrigada por por toda a ajuda, principalmente em informática.

Agradeço a professora Eliana, por se disponibilizar em ensinar e orientar nos momentos de dúvidas.

Aos membros da banca, professora Gilselena, professora Eliana, professora Jaqueline por avaliarem e tornar melhor essa dissertação.

Professora Jaqueline, muito obrigada por fazer parte deste projeto.

Acredito que ninguém caminha sozinho e elabora trabalhos tão grandiosos. Muitas pessoas precisam mais que as outras, algumas com mais dificuldades outras com facilidades. Sempre todos aprendem algo novo.

Enfim, a todos que de alguma forma estiveram presente nessa caminhada, meu muito OBRIGADA.

“A maior recompensa pelo trabalho, não é o que você ganha, mas sim o que se torna através dele.”

(John Ruskin)

GOBO, Elisângela de Fátima. **Colonização por microrganismos do grupo "ESKAPE" em recém-nascidos hospitalizados em unidades neonatais em um hospital universitário**. 2020. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

RESUMO

Introdução: O grupo SKAPE, composto por *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos (BGN NF-CR), Enterobactérias resistentes a cefalosporinas de terceira e quarta geração (ESBL) e resistentes a carbapenêmicos (CRE). Representam uma ameaça à saúde pública, em decorrência das limitações na terapia antimicrobiana. A colonização por estes microrganismos é um fator que favorece o desenvolvimento de infecções, em especial nos pacientes imunocomprometidos, como os neonatos de baixo peso. **Objetivo:** Avaliar a epidemiologia de recém nascidos internados em unidades neonatais, colonizados por microrganismos do grupo ESKAPE, num período de 20 anos e realizar análise molecular das principais Enterobactérias ESBL nos últimos dois anos de estudo. **Método:** Foram analisados retrospectivamente os resultados em banco de dados do sistema LABHOS/LAC/HU de amostras de swab de vigilância nos anos de 2000 a 2017, e incluída apenas uma cultura por paciente, sendo a primeira a ser positivada durante a internação. No período de 2018 e 2019 foi realizado estudo prospectivo, transversal, com amostras de swab de vigilância coletados semanalmente de RN internados nas unidades neonatais. Dentre as amostras positivas para Enterobactéria produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) deste grupo, foi realizada análise de similaridade clonal e identificação genotípica para os genes de resistência. **Resultados:** Entre os microrganismos multirresistentes mais frequentemente identificados destacam-se os bacilos Gram-negativos (929/1107 – 84,0%). Enterobactérias ESBL, foram responsáveis pela colonização de 753 (70,0%) dos RN. A colonização por Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos também foi evidenciada, com menor frequência (2,0%). A densidade de incidência média de *Klebsiella pneumoniae* ESBL durante o período foi 2,3/1.000 pacientes-dia, com variações de zero em 2000 a cerca de cinco em 2013, 2015, 2018 e 2019. Entre os cocos Gram-positivos os mais frequentes foram *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), identificados em 11% das culturas de amostras de vigilância e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE) em (5,0%), ambos relacionados a colonização dos RN. Entre as Enterobactérias ESBL identificadas fenotipicamente nos anos de 2018 e 2019, houve uma alta frequência para *Klebsiella pneumoniae* ESBL (51%), das quais 45% foram submetidas a análise genotípica. As principais Enzimas ESBL identificadas foram TEM (68,0%), SHV (63,0%) e CTX-M1/M15 (95,0%). **Conclusão:** a frequência para os microrganismos do grupo ESKAPE, foi elevada nesses 20 anos de estudo, principalmente para os bacilos Gram-negativos, com destaque para *Klebsiella pneumoniae* ESBL que esteve em alta ao longo dos anos na colonização dos neonatos. A colonização geralmente precede a infecção, elevando a mortalidade e morbidade nos sistemas de saúde, e desta forma, medidas efetivas de prevenção e controle se fazem necessárias.

Palavras-chave: fármaco resistência múltipla; cocos gram positivos; bacilos gram negativos; recém nascidos; genes MDR; colonização.

GOBO, Elisangela de Fátima. **Colonization by microorganisms of the group "ESKAPE" in newborns hospitalized in neonatal units in a university hospital.** 2020. 81 p. Dissertation (Master's Program in Clinical and Laboratory Physiopathology) – State University of Londrina, Londrina. 2020.

ABSTRACT

Introduction: The SKAPE group, composed of *Enterococcus faecium* vancomycin-resistant (VRE), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* resistant to carbapenems (BGN NF-CR), third and fourth generation cephalosporin-resistant enterobacteria (ESBL) and resistant to carbapenem. They represent a threat to public health, due to limitations in antimicrobial therapy. Colonization by these microorganisms is a factor that favors the development of infections, especially in immunocompromised patients, such as low birth weight neonates. **Objective:** To evaluate the epidemiology of newborns admitted to neonatal units, colonized by microorganisms of the ESKAPE group, over a period of 20 years and to perform molecular analysis of the main ESBL Enterobacteria in the last two years of study. **Method:** The results were retrospectively analyzed in the LABHOS / LAC / HU database of surveillance swab samples in the years 2000 to 2017, and only one culture per patient was included, the first being positive during hospitalization. In the period 2018-2019, a prospective, cross-sectional study was carried out, with swab samples of surveillance collected weekly from newborns hospitalized in neonatal units. Among the positive samples for Enterobacteria that produce extended spectrum β -lactamases (ESBL) in this group, clonal similarity analysis and genotypic identification for resistance genes were performed. **Results:** Among the most frequently identified multi-resistant microorganisms, Gram negative bacilli stand out (929/1107 - 84.0%). ESBL Enterobacteria, were responsible for the colonization of 753 (70.0%) newborns. Colonization by carbapenem-resistant Enterobacteria was also observed, less frequently (2.0%). The mean incidence density of *Klebsiella pneumoniae* ESBL during the period was 2.3 / 1,000 patient-days, with variations from zero in 2000 to around five in 2013, 2015, 2018 and 2019. Among the most frequent Gram-positive cocci were methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), identified in 11% of cultures from surveillance samples and *Enterococcus* spp. resistant to vancomycin (VRE) in (5.0%), both related to colonization of newborns. Among the ESBL Enterobacteria identified phenotypically in the years 2018 and 2019, there was a high frequency for *Klebsiella pneumoniae* ESBL (51%), of which 45% underwent genotypic analysis. The main ESBL enzymes identified were TEM (68.0%), SHV (63.0%) and CTX M1 / M15 (95.0%). **Conclusion:** the frequency for microorganisms in the ESKAPE group, was high in these 20 years of study, mainly for Gram-negative bacilli, with emphasis on *Klebsiella pneumoniae* ESBL, which was on the rise over the years in the colonization of neonates. Colonization usually precedes infection, increasing mortality and morbidity in health systems, and therefore, effective prevention and control measures are necessary.

Key words: resistance to multiple drugs; gram positive coconuts; gram negative bacilli; newborns; MDR genes; colonization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Fluxograma com números de admissões total, número de admissões por paciente/dia. Número de microrganismos encontrados na colonização de recém nascidos hospitalizados entre os anos de 2000 a 2019..... 30
- Figura 2 –** Percentual de frequência de colonização por patógenos do grupo ESKAPE para 1.078 recém-nascidos internados em UTIN, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019..... 31
- Figura 3 –** Densidade de incidência de colonização por bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos do grupo ESKAPE, isolados de recém-nascidos internados em UTN de um hospital do sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019..... 32
- Figura 4 –** Densidade de incidência de colonização por bacilos Gram-negativos produtores de ESBL e resistentes a carbapenêmicos, isolados de recém-nascidos internados em UTIN de um hospital do sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro 33
- Figura 5 –** Densidade de incidência de colonização de bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenêmicos, isolados de recém-nascidos internados em UTN de um hospital do sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019..... 33
- Figura 6 –** Densidade de incidência de colonização por cocos Gram positivos do grupo ESKAPE, isoladas de recém-nascidos internados em UTN de um hospital do sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019..... 34
- Figura 7 –** Fluxograma: número de admissões de recém nascidos internados em setor neonatal, número de pacientes/dia, número de microrganismos isolados, entre agosto de 2018 a agosto 2019..... 45
- Figura 8 –** Distribuição da frequência de bacilos Gram negativos multirresistentes (n=172) identificados em culturas de vigilância de neonatos, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019 46

Figura 9 – Diagrama de controle de Enterobactérias isoladas de culturas de swabs retal de neonatos, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019	47
Figura 10 – Densidade de incidência de colonização por <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> , produtores de ESBL, isolados de culturas de vigilância, por 1.000 neonatos-dia, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019	47
Figura 11 – Frequência de enzimas do tipo ESBL em <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de culturas de vigilância em neonatos, no período de agosto de 2018 a agosto de 2019	48
Figura 12 – Número de enzimas do tipo ESBL de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por número de isolados de Recém nascidos.....	49
Figura 13 – Dendrograma de 38 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , enzimas de resistência e data de colonização	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes codificadores das enzimas blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, e ERIC, sequência dos oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado e referências	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGN	Bacilos Gram negativos
BGNMR	Bacilos Gram negativos multirresistentes
BI	Bloodstream infection
CDC	Centers for Disease Control
CGP	Cocos Gram positivos
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CR	Resistentes a carbapenêmicos
CRE	Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos
DI	Densidade de incidência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECDC	European Centers for Disease Prevention and Control
E-ESBL	Enterobactérias ESBL
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamases
EUA	Estados Unidos da América
IR	Inguinal/retal
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecção do Trato Urinário
Kpn	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
MC	MacConkey
MDRS	Multi-drug resistant microorganisms
MR	Multirresistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina
NF	Não fermentador
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD-PCR	Random Amplified Polymorphic DNA
RN	Recém nascidos
TSB	Tryptone Soy Broth
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos

UTIN Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
VRE *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
1.1	MICROBIOTA INTESTINAL DO NEONATO	4
1.2	MICROORGANISMOS DO GRUPO ESKAPE	6
1.2.1	<i>Enterococcus</i> spp.....	9
1.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.2.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1.2.4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14
1.2.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.2.6	<i>Enterobacter</i> spp.....	15
1.3	EPIDEMIOLOGIA DE BACILOS GRAM NEGATIVOS MULTIRRESISTENTES EM NEONATOS.....	15
1.4	<i>K. PNEUMONIAE</i> PRODUTORAS DE ESBL	17
2	OBJETIVO	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
3.1	LOCAL DE ESTUDO.....	20
3.2	DELINEAMENTO	20
3.3	BIOÉTICA	21
3.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	21
3.5	AMOSTRAS.....	21
3.6	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE INCIDÊNCIA	22
3.7	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE MICROORGANISMOS DO GRUPO ESKAPE	22
3.8	REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS	23
3.9	MÉTODOS GENOTÍPICOS	23
3.9.1	<i>Extração do DNA</i>	23
3.9.2	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	24
3.9.3	<i>Eletroforese</i>	24

4	RESULTADOS	26
	ARTIGO 1 – COLONIZAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS POR PATÓGENOS DO GRUPO ESKAPE: LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE 20 ANOS.....	27
	ARTIGO 2 – PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL ISOLADAS DE NEONATOS HOSPITALIZADOS.....	41
5	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Infecções por microrganismos resistentes têm se tornado prevalentes nas últimas décadas e constituem um sério problema de saúde pública ao redor do mundo. As opções terapêuticas para esses agentes são limitadas, o que acarreta um maior risco de mortalidade hospitalar (SORSA et al., 2019; THAPA; SAPKOTA, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 700 mil pessoas morrem todos os anos por infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos e medidas de controle devem ser tomadas para conter as estimativas de 10 milhões de mortes até 2050 em decorrência da resistência (WHO, 2020).

Recém-nascidos internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) tendem a adquirir infecções mais graves do que outros pacientes, pois são vulneráveis a infecções por microrganismos oportunistas e resistentes a múltiplos antimicrobianos. Essas infecções relacionam-se com tempo de internação, procedimentos invasivos e terapia antimicrobiana (JOHNSON; QUACH, 2017; LAKE et al., 2018; WEINER-LASTINGER et al., 2020).

1.1 MICROBIOTA INTESTINAL DO NEONATO

A colonização normal do recém-nascido inicia-se intraútero, continuando por meio do contato com a mãe e com o ambiente, até que ocorra um balanço delicado e seja estabelecida a microbiota normal endógena neonatal. O processo de colonização caracteriza-se pela presença do microrganismo no hospedeiro na ausência de manifestações clínicas e resposta imunológica no momento do isolamento bacteriano (HOUGHTLING; WALKER, 2015).

Múltiplos fatores podem influenciar a aquisição de microrganismos na fase neonatal: a microbiota genital materna, o tipo de alimentação do recém-nascido, o pessoal em contato direto e o ambiente em que a criança nasce e permanece, incluindo a microbiota de objetos e de outros RNs deste ambiente (MUSSI-PINHATA; DO NASCIMENTO, 2001).

Os bebês internados em UTIN frequentemente recebem agentes antimicrobianos em caso de infecções suspeitas ou confirmadas, como profilaxia pré-operatória. Quando comparada com bebês nascidos a termo e saudáveis, a

colonização de bebês prematuros, internados em UTIN é retardada e os bacilos Gram-negativos patogênicos são mais comuns. O uso geral de antimicrobianos, como as cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos demonstraram estar associados à colonização ou infecções causadas por bacilos Gram-negativos resistentes. (CLOCK et al., 2017).

O tratamento de neonatos hospitalizados, com antimicrobianos de amplo espectro, frequentemente leva à colonização intestinal com bactérias Gram-negativas multirresistentes. O trato gastrointestinal funciona, assim, como um reservatório para disseminação destes microrganismos entre pacientes (SIMON; TENENBAUM, 2013; VERSPORTEN et al., 2014).

A colonização da mucosa por microrganismos Gram-negativos é um processo normal, mas muitas vezes pode servir como uma fonte de infecção invasiva. Numerosos estudos avaliaram os fatores associados à colonização precoce da mucosa, como microbiota materna, uso de antimicrobianos durante o parto, ruptura prematura de membranas, via de parto, idade gestacional e ambiente (PARM et al., 2011). Sendo que a transmissão da colonização de mães para os bebês desempenha um papel importante, com potencial para o desenvolvimento subsequente de sepse neonatal com isolados de origem materna (PROCIANOY; SILVEIRA, 2020). A transmissão de bactérias pode ocorrer da mãe para o bebê, uma vez que estão em contato direto e constante (BULABULA; DRAMOWSKI; MEHTAR, 2020).

A colonização de pacientes críticos tem sido apontada como facilitador para ocorrência de Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS), aumentando as possibilidades de complicações e até mesmo óbito. Colonização de pele e mucosas, por microrganismos resistentes (MR), de pacientes hospitalizados tem merecido crescente atenção dos serviços de saúde, mas não há ainda estimativas do impacto mundial dessas colonizações. Sabe-se que a identificação de indivíduos colonizados, mesmo quando esses não apresentam sinais de infecção ativa, contribui para a redução da circulação desse agente e reduz sua participação na etiologia das IRAS (ARCANJO; et.al, 2017).

Em alguns países, principalmente aqueles em desenvolvimento, aproximadamente metade dos pacientes internados na UTIN adquirem alguma infecção ao longo da sua internação (SORSA et al., 2019). Segundo a OMS 130 milhões de neonatos nascem todo ano e mais de 10 milhões vão a óbito antes de

completarem cinco anos de idade, sendo um terço desses óbitos relacionados a infecções neonatais (WHO, 2017).

A prevenção de infecções por MR inclui triagem para colonização, administração de antimicrobianos e práticas rigorosas de controle de infecção, incluindo higienização das mãos, uso de equipamento de proteção individual (EPI) adequado e redução do uso de dispositivos invasivos. Muitos neonatos colonizados com MR desenvolvem infecção pelo mesmo microrganismo e a presença de componentes da microbiota normal do intestino podem ter um efeito protetor ao exibir atividade antimicrobiana contra patógenos intestinais (BALLOT et al., 2019).

Compreender a epidemiologia das IRAS em populações pediátricas, bem como conhecer os patógenos implicados nessas infecções, pode ajudar unidades de saúde a desenvolver políticas direcionadas de prevenção de IRAS para pacientes pediátricos (LAKE et al., 2018; WEINER et al., 2016).

1.2 MICRORGANISMOS DO GRUPO ESKAPE

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA - *Infectious Disease Society of America*), em 2008, agrupou seis gêneros de patógenos resistentes, que causam a maioria das IRAS, pelo acrônimo “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp.) devido à sua capacidade de "escaparem" dos efeitos da maioria dos agentes antimicrobianos, seja pela aquisição de genes de resistência, seja pela capacidade de formar biofilmes (KARLOWSKY et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020). Posteriormente, em 2017, a OMS atribuiu a esse grupo o status de “patógenos prioritários” para os quais o desenvolvimento de novos antimicrobianos é urgente (HARBARTH et al., 2019).

As bactérias do grupo ESKAPE representam modelos de resistência, patogênese e transmissão de doenças. Há uma variedade de mecanismos de resistência antimicrobiana utilizada por estes patógenos incluindo: inativação enzimática, modificação de alvos de drogas, alteração da permeabilidade celular por meio da perda de porinas ou aumento na expressão de bombas de efluxo e proteção mecânica fornecida pela formação de biofilme (DE OLIVEIRA et al., 2020).

A resistência antimicrobiana nesses patógenos é uma grande ameaça aos sistemas de saúde pública em todo o mundo e parece provável que aumente no futuro

próximo, de acordo com o aparecimento de mecanismos de resistência. Isso resulta na escassez de potenciais agentes terapêuticos na prática clínica, que causa preocupações reais, mas deve desencadear a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos ou novas abordagens para controlar as infecções que eles causam (WHO, 2020).

Os patógenos do grupo ESKAPE, são os principais responsáveis pelas IRAS, e ao mesmo tempo, representam os maiores riscos em relação a padrões de resistência que limitem as alternativas terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2020).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antimicrobianos de acordo com suas características, mas também podem adquirir resistência por meio de transferência horizontal de elementos genéticos móveis ou por mutações em genes cromossômicos. Os mecanismos pelos quais podem se tornar resistentes incluem: diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da célula bacteriana, modificação do alvo ou inativação do antimicrobiano (NAVEED et al., 2019).

Conhecer os mecanismos de resistência destes patógenos pode auxiliar no entendimento da epidemiologia e, assim, orientar o desenvolvimento de novas combinações de antimicrobianos, devem auxiliar na descoberta e desenvolvimento de novos agentes que podem contornar ou neutralizar os mecanismos de resistência existentes (BLAIR 2015).

Entre as diferentes classes de antimicrobianos conhecidas, os β -lactâmicos são a mais amplamente utilizados em ambiente hospitalar devido à sua segurança, eficácia e amplitude de espectro de atividade. Desde a descoberta da Benzilpenicilina, na década de 1920, surgiram novas subclasses para aumentar o espectro de atividade ou para abordar mecanismos de resistência específicos que surgiram. Basicamente, a classe dos β -lactâmicos é composta por penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, todos os quais incluem o anel β -lactâmico em sua estrutura (BUSH; BRADFORD, 2019).

Os antibióticos β -lactâmicos são agentes bactericidas que interrompem a formação da parede celular bacteriana como resultado da ligação covalente a proteínas essenciais de ligação à penicilina, do inglês *Penicillin Binding Protein* (PBPs). Essas enzimas estão envolvidas nas etapas terminais da formação da peptidoglicana, tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas. Cada espécie bacteriana tem seu próprio conjunto de PBPs, que pode variar de três a oito enzimas por espécie (ZAPUN; CONTRERAS-MARTEL; VERNET, 2008). A inibição

da transpeptidação da peptidoglicana bacteriana ocorre pela semelhança estrutural da penicilina G com o dipeptídeo D- ala-D- ala terminal da peptidoglicana.

A resistência a antimicrobianos em patógenos Gram-negativos pode ocorrer por diminuição da concentração do antimicrobiano ou modificação enzimática da droga. Por apresentarem membrana externa, as bactérias Gram-negativas são menos permeáveis do que as Gram-positivas. Para acessar as PBPs na superfície da membrana interna, os β -lactâmicos precisam se difundir ou atravessar diretamente os canais de porinas na membrana externa. A redução ou modificação das porinas limita a entrada dos antimicrobianos, levando à redução das concentrações no interior das bactérias como ocorre em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Enterobacteriaceae* para cefalosporinas e carbapenêmicos (HAENNI et al., 2017; SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2019).

As bombas de efluxo são importantes determinantes da resistência a múltiplas drogas em muitos patógenos Gram-negativos, particularmente em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Quando super-expressas podem conferir altos níveis de resistência. A maioria é codificada por genes cromossomais, mas podem ser transferidos por elementos genéticos móveis (ALIZADEH, et al. 2020).

A pressão seletiva e a frequência com que determinantes de resistência são mobilizados, o que resultaram na proliferação e disseminação de inúmeras variantes de β -lactamases. Atualmente já foram descritas mais de 3.000 β -lactamases (BUSH; BRADFORD, 2020; SAHOO et al., 2019).

À aquisição e transferência de genes de resistência a antibióticos dentro ou por diferentes espécies de bactérias Gram-negativas através de plasmídeos e transposons móveis são relatadas como a principal causa da produção de β -lactamases. De particular importância é a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) que têm a capacidade de hidrolisar a cefalosporina de alta geração e causam resistência a muitos antimicrobianos, incluindo as cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima. (BEYENE et al., 2019)

As primeiras β -lactamases, TEM e SHV, que eram ativas contra β -lactâmicos de primeira geração, foram seguidas por β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) como CTX-M. O transporte de diversas ESBLs e carbapenemases, incluindo o IMP (imipenemase), VIM (metaló β -lactamase codificado por íntegron de Verona), KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), OXA (oxacilinase) e NDM (New Delhi) em bactérias Gram-negativas, como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* levou

ao surgimento de isolados que resistem a todos os antibióticos β -lactâmicos (BLAIR et al., 2015; SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020).

1.2.1 *Enterococcus* spp.

Enterococos são cocos Gram-positivos, catalase-negativos, anaeróbios facultativos e resistentes a condições ambientais adversas, como temperatura, pH e altas concentrações de sal. O gênero *Enterococcus* faz parte da família *Enterococcaceae*, que é composto de 70 espécies e duas subespécies, sendo *E. faecium* e *faecalis* as espécies de maior importância clínica (RAZA et al., 2018).

Enterococos são patógenos oportunistas importantes, não apenas formam biofilmes em cateteres e dispositivos médicos implantados, mas também porque causam infecções do trato urinário, bacteremia, endocardite, queimaduras e infecções de feridas cirúrgicas, abdômen e infecções biliares (ZAHEER et al., 2020).

Inicialmente considerados sem importância clínica, *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) emergiram no final dos anos 80 como patógenos de infecções hospitalares (RAZA et al., 2018). Atualmente essas bactérias representam patógenos hospitalares oportunistas que causam infecções de difícil tratamento devido à resistência intrínseca e adquirida a uma infinidade de antimicrobianos (VAN HARTEN et al., 2017). A maioria das infecções por *Enterococcus* tem origem endógena, mas a infecção cruzada pode ocorrer em pacientes hospitalizados, geralmente relacionados à contaminação ambiental (PERUGINI et al., 2011; RAZA et al., 2018).

São intrinsecamente resistentes a uma variedade de agentes antimicrobianos, incluindo cefalosporinas, sulfonamidas e baixas concentrações de aminoglicosídeos. Suas proteínas de ligação à penicilina têm baixa afinidade por beta lactâmicos. Além da resistência intrínseca e adquirida, *Enterococcus* são eficientes na troca de elementos genéticos móveis contendo genes de resistência a antimicrobianos (PERUGINI et al., 2011).

E. faecalis e *E. faecium*, expressam uma proteína de origem cromossômica de baixa afinidade, homóloga à PBP2a codificada no MRSA, a PBP5, que confere níveis de resistência baixos para *E. faecalis* e elevados para *E. faecium* (ZAPUN; CONTRERAS-MARTEL; VERNET, 2008).

Os Glicopeptídeos são muito utilizados no tratamento de microrganismos Gram-positivos. Em organismos susceptíveis, a biossíntese da parede celular

bacteriana é inibida pela ligação ao dipeptídeo D-ala–D-ala. A resistência à vancomicina em *Enterococcus*, do inglês *Vancomycin-resistant Enterococci* (VRE) se dá pela alteração do dipeptídeo para D-ala-D-lactato ou D-ala-D-serina pela aquisição de grupos de genes *van*. Até o momento, nove *clusters* de genes *van* foram classificados. A maioria das infecções por VRE são causadas por *E. faecium* e *E. faecalis* portadores dos genes *vanA* caracterizados por resistência elevada à vancomicina e a teicoplanina (RAZA et al., 2018).

As taxas de resistência antimicrobiana entre os *Enterococcus* são particularmente preocupantes, especialmente a incidência de VRE, que está associado principalmente *E. faecium*. Na América do Norte, VRE surgiu durante o final dos anos 1980, alcançou 61% em 2002 e, a partir de então, se espalharam pelo resto do mundo.

Dados do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), obtidos entre 2012 a 2017, evidenciaram uma diminuição na frequência de VRE ao longo dos anos (CDC, 2019). Diversos surtos têm sido relatados na Europa, Ásia, América do Sul e Austrália (ANDERSSON et al., 2019; PERUGINI et al., 2011; SUZUKI et al., 2017).

O tratamento de infecções por VRE depende de antimicrobianos que são de alto custo, eficácia diminuída e um maior risco de toxicidade. A maioria dos estudos evidenciou, ainda, mortalidade excessiva, tempo de internação hospitalar e altos custos para tratamento, especialmente em infecções da corrente sanguínea (CHIANG et al., 2017; CRANK; O'DRISCOLL, 2015; PREMATUNGE et al., 2016).

1.2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus é um gênero composto por cocos Gram-positivos, aeróbios a anaeróbios facultativos, que possui 63 espécies e 30 subespécies e que incluem membros da microbiota normal da pele, trato gastrointestinal e epitélio nasal. *S. aureus* é o patógeno mais importante, clinicamente, isolado tanto na comunidade como em hospitais (PARTE et al., 2020). Sua importância está relacionada à sua virulência, resistência antimicrobiana e associação com diversas doenças. Além disso, essa bactéria pode se adaptar a diferentes ambientes, pois apresenta alta plasticidade metabólica e pode permanecer viável por muito tempo em objetos inanimados, o que facilita sua disseminação (RINCÓN et al., 2014).

A resistência à penicilina surgiu neste microrganismo em 1940 devido à aquisição de uma β -lactamase, codificada em plasmídeos, que se espalhou rapidamente, chamada penicilinase. Já a resistência à meticilina, foi relatada inicialmente em 1961, e é mediado pela aquisição do gene *mecA* de origem cromossômica. (RINCÓN, et.al., 2014)

S. aureus resistente à meticilina, do inglês *Methicillin-Resistant S. aureus* (MRSA), tem sido uma das principais causas de infecção hospitalar desde os anos 80. A primeira infecção por MRSA, em uma UTIN foi relatada nos Estados Unidos (EUA), em 1981(WEEKS et al., 1981). As infecções por MRSA e *S. aureus* sensíveis à meticilina, do inglês *Methicillin-susceptible S. aureus* (MSSA) têm aumentado recentemente em mulheres grávidas e neonatos hospitalizados em UTN. Assim, a colonização por *S. aureus* é comum em pacientes prematuros e a infecção está associada a significativa morbimortalidade.

MRSA se tornaram resistentes pela aquisição do cassete cromossômico estafilocócico, do inglês *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) que confere a resistência à meticilina. Este carrega o gene *mecA*, que codifica uma proteína PBP que possui baixa afinidade pelos β -lactâmicos, mas que permitem que a biossíntese da parede celular, a PBP2a (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Treze tipos de SCC*mec* foram identificados até o momento em *S. aureus* (BAIG et al., 2018). Além do gene *mecA*, outros dois genes homólogos, designados *mecB* e *mecC*, foram identificados recentemente em MRSA (OLIVEIRA et al., 2020).

Estratégias ativas de vigilância e descolonização podem prevenir infecções invasivas, melhorando o estado geral dos bebês de alto risco. Nos últimos anos, vários estudos relataram diferentes protocolos de gerenciamento de surtos de *S. aureus* e diferentes programas de vigilância ativa para as cepas resistentes e sensíveis à meticilina, em diferentes contextos de saúde e populações de pacientes. (WISGRILL, et al., 2018).

Uma diretriz para a detecção de portadores de MRSA ,em situações de surto em UTIN, recomenda a obtenção de culturas microbiológicas somente a partir das narinas (DE BRITO et al., 2015). No entanto, em uma pesquisa sobre práticas para identificar portadores de MRSA, em UTN nos EUA, 47% dos bebês apresentaram locais anatômicos adicionais, incluindo axila, virilha, áreas pós-auriculares, faringe, umbigo e / ou reto (AKINBOYO et al., 2018).

Muito desse aumento foi relatado como impulsionado pela presença de *S. aureus* pertencentes à comunidade (CA-MRSA), que geralmente causam infecções em pacientes sem fatores de risco tradicionais. (LIN, et.al.,2018). As infecções por CA-MRSA surgiram entre a população indígena da Austrália nos anos 80 e em comunidades saudáveis dos Estados Unidos e Canadá nos anos 90 (DIEKEMA et al., 2019).

Na União Europeia, verifica-se uma tendência decrescente de MRSA entre 2015 e 2018, variando de 0% a 43,0% entre os países. A implementação de recomendações sobre a prevenção da disseminação de MRSA, com foco na melhoria da prevenção e controle de infecções e no uso prudente de antimicrobianos provavelmente são os responsáveis por esta diminuição (ECDC, 2019). Apesar desse desenvolvimento positivo, MRSA continua sendo um patógeno importante na Europa. É uma das causas mais comuns de infecções bacterianas graves, exibindo uma carga elevada em termos de morbidade e mortalidade (CASSINI et al., 2019).

Para o tratamento das infecções causadas por MRSA, vancomicina e teicoplanina são os antimicrobianos de primeira escolha, no entanto a pressão seletiva que esses fármacos exercem, podem induzir o surgimento de isolados de *S. aureus* com sensibilidade diminuída à vancomicina, conhecidos como Vancomycin-Intermediate *S. aureus* (VISA). Os primeiros relatos ocorreram pela primeira vez no Japão em meados da década de 1990 (HIRAMATSU, 1997), e atualmente já foram identificados em países da Ásia, EUA, América do Sul e Europa (CHAMON et al., 2020; DUARTE et al., 2018; HOWDEN et al., 2010; HUANG et al., 2016; WILCOX et al., 2019). Essa forma geralmente surge pós exposição prolongada à vancomicina, no qual uma pequena subpopulação de células com sensibilidade reduzida conhecido como hVISA, cujo mecanismo não está totalmente entendido, embora saiba-se que provavelmente ocorram alterações nos genes reguladores que levam ao espessamento da parede celular e atividade auto lítica, bem como um excesso de resíduos de D-ala-D-ala (CAMERON et al., 2017).

S. aureus resistentes à vancomicina, do inglês *Vancomycin-Resistant S. aureus* (VRSA), foram reportados pela primeira vez em 2002 nos Estados Unidos pela aquisição do operon *van* de VRE, no entanto permanecem raros na atualidade, tendo sido identificados apenas 52 casos em diversos países como Estados Unidos, Índia, Irã, Paquistão, Brasil e Portugal (CONG; YANG; RAO, 2020).

1.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae, bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, membro da família *Enterobacteriaceae*, capaz de sobreviver em objetos inanimados ou fômites, colonizar o corpo humano e causar infecções graves em pacientes imunocomprometidos. O gênero *Klebsiella* é composto por 24 espécies e 8 subespécies. São patógenos bacterianos frequentemente associados a IRAS (PARTE et al., 2020).

Nos últimos anos, esse microrganismo, altamente resistente a vários agentes antimicrobianos, tem sido relacionado etiológicamente a infecções oportunistas graves e surtos em berçários e unidades de terapia intensiva neonatal. Faz parte da microbiota do trato gastrointestinal dos recém-nascidos e que, nos últimos anos, responde cada vez menos ao tratamento com antimicrobianos devido à existência de cepas produtoras da enzima β -lactamase (GARCÍA et al., 2016).

Essas espécies ganharam notoriedade recentemente devido à sua propensão em adquirir resistência antimicrobiana à múltiplas drogas (LANDRY et al., 2014). Nos últimos anos, adquiriu resistência a uma grande variedade de antimicrobianos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, com resistência ocasionada pela produção de enzimas β -lactamases, (BUSH; JACOBY, 2010; QUEENAN; BUSH, 2007).

Frequentemente, as β -lactamase de espectro estendido do inglês (*Extended Spectrum Beta-Lactamase* - ESBL), são codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e íntegrans, os quais também carregam genes de resistência a outras classes de antimicrobianos. Por outro lado, o uso de antimicrobianos na produção animal tem favorecido a seleção de enterobactérias produtoras de ESBL com potencial para disseminação na comunidade por meio de contato direto e consumo de alimentos contaminados, podendo ainda se estabelecer nos ecossistemas. (SILVA; LINCOPAN, 2012)

A prevalência de *K. pneumoniae* multirresistente, aumentou dramaticamente nos últimos anos. *K. pneumoniae* MR frequentemente exhibe resistência a cefalosporinas de espectro estendido devido à sua produção de ESBLs. As bactérias produtoras de ESBL causam maior morbidade, mortalidade para os pacientes internados. Isso limita sua eficiência e tratamento clínico, obtendo resultados de tratamento indesejáveis (WANG et al., 2020).

1.2.4 *Acinetobacter baumannii*

O gênero *Acinetobacter* é composto de 78 espécies que podem ser divididas em dois complexos: o complexo *Acinetobacter baumannii* - o grupo que inclui a maioria das espécies causadoras de doenças (*A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*) - e o grupo geralmente menos patogênico *Acinetobacter non-baumannii* (ZARRILLI et al., 2018).

Acinetobacter spp. são bactérias Gram-negativas, não fermentadoras de glicose, que surgiram nos últimos anos como causas de infecções associadas à saúde e surtos hospitalares, especialmente em pacientes de unidades de terapia intensiva (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

Aproximadamente 45% de todos isolados globais de *A. baumannii* são considerados MR, com taxas superiores a 60% no Estados Unidos (CDC, 2019) e a 90% na América Latina e Oriente Médio. Além da resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos, a resistência adquirida dificulta ainda mais o tratamento de infecções graves em grupos de pacientes já vulneráveis (BRINK; RICHARDS, 2020; KARLOWSKY et al., 2017; RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018).

O mecanismo mais importante de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* é a inativação enzimática pela produção de beta-lactamases, que hidrolisam carbapenêmicos. Estas enzimas incluem as oxacilinases, serino β -lactamases codificadas pelos genes *bla* OXA-23, *bla* OXA-24/40 e *bla* OXA-58 identificados no cromossomo ou em plasmídeos de isolados de *A. baumannii* (SINGH; THANGARAJ; CHAKRABARTI, 2013).

1.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Bactéria Gram-negativa não fermentadora, em forma de bastonete, que faz parte da microbiota intestinal normal. As taxas de infecção são bastante baixas na população em geral, mas são elevadas em pacientes hospitalizados, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (ECDC, 2019).

P. aeruginosa são capazes de formar biofilme e são intrinsecamente resistentes a muitos antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos. Muitas enzimas ESBL como PER, SHV, PME, GES, VEB e CTX-M e diversos tipos de metalo-beta-lactamases

como IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, entre outras. Além desse mecanismos, a resistência a imipenem também pode ocorrer devido a mutações no gene *oprD*, responsável pela produção de porinas (BASSETTI et al., 2018).

Enquanto *P. aeruginosa* é responsável por 10% de todas as infecções hospitalares, também há um reconhecimento crescente desse microrganismo como causa de infecção adquirida na comunidade. A plasticidade e adaptabilidade do genoma de *P. aeruginosa*, conferidas por um repertório de genes reguladores, são características chave no patógeno (YAYAN; GHEBREMEDHIN; RASCHE, 2015).

1.2.6 *Enterobacter* spp.

O gênero *Enterobacter* é composto por 48 espécies de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos que pertencem à família *Enterobacteriaceae* (PARTE et al., 2020).

Esses patógenos frequentemente apresentam multirresistência, principalmente devido à sua adaptação ao ambiente hospitalar e sua capacidade de adquirir elementos genéticos móveis contendo genes de resistência e virulência. Essas espécies apresentam resistência intrínseca à ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primeira geração e cefoxitina devido à expressão de uma β -lactamase AmpC constitutiva. Além disso, tem sido relatada a produção de β -lactamases de espectro estendido nessas bactérias, o que dificulta seu tratamento (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DE BACILOS GRAM NEGATIVOS MULTIRRESISTENTES EM NEONATOS

Estudos realizados na última década têm evidenciado um aumento na prevalência de bacilos Gram-negativos MR colonizando RN internados em UTIN ao redor do mundo, porém, a frequência e a diversidade de espécies envolvidas diferem de acordo com a região e a ocorrência de surtos (BAIER et al., 2019; LEIKIN-ZACH et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; ROBERTS et al., 2019).

As infecções causadas por microrganismos multirresistentes constituem uma adversidade severa em neonatos admitidos em UTN, e acarretam internação prolongada, maior uso de antimicrobianos, e conseqüentemente favorecem a

colonização com MR, em especial, por bacilos gram-negativos potencialmente patogênicos favorecendo o desenvolvimento de IRAS (ANVISA, 2017).

A produção de ESBL em bacilos Gram-negativos é descrita como o mecanismo de resistência antimicrobiana mais comum nas UTINs e está relacionada a elevadas taxas de mortalidade e morbidade (O'NEILL, 2016; WHO, 2017). Embora os microrganismos produtores de ESBL sejam uma preocupação global, eles representam um grande problema para pacientes nos países em desenvolvimento.

Diferentes estudos multicêntricos mostraram as mesmas tendências: aumento das taxas de resistência à ceftriaxona entre outros agentes antimicrobianos ao longo dos anos, correlacionando-se com uma detecção crescente de ESBLs em todo o mundo e as maiores taxas de produção de ESBL está entre *K. pneumoniae* e *E. coli* na América Latina, quando comparadas com outras regiões do mundo.

K. pneumoniae produtora de ESBL foram detectados em uma taxa geral de 26% em todo o mundo, com uma proporção maior nos centros Latino-americanos (35%) em comparação com a Europa (20%) e a América do Norte (10%) (GARCÍA et al., 2016).

Na América Latina, a proporção de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL é de 26 a 35%, mas no Brasil, Colômbia e Venezuela, foi relatado que até 60% das espécies de *Klebsiella* expressam esta enzima. No oeste do México, a frequência de ESBL em espécies de *E. coli* é de 16,3% e em *K. pneumoniae* 26,9%. A ESBL predominante é a CTX-M-15 (85%) , embora na década anterior o tipo predominante, em Enterobactérias, isoladas de pacientes pediátricos tenha sido o tipo SHV-5 (LONA-REYES et al., 2019a).

Em estudos de vigilância de isolados clínicos na Nigéria encontrou-se uma incidência de 8, 33,5% e 9,3, 10,3%, respectivamente, para *E. coli* e *Klebsiella* spp. produtores de ESBL e carbapenemase. Na Nigéria, as infecções hospitalares, são a terceira principal causa de mortes neonatais após prematuridade e asfixia do nascimento. Da vigilância em neonatos, um estudo piloto de 2013, na Nigéria central, descobriu que Enterobactérias ESBL, representava 50% dos agentes etiológicos da sepse nessa faixa etária (NEEMANN et al., 2019).

A circulação endêmica de bacilos Gram-negativos em unidades neonatais são difíceis de controlar. A utilização de culturas de vigilância tem sido apontada como intervenção simples na tentativa de conter surtos em diversos estudos (BULABULA; DRAMOWSKI; MEHTAR, 2020; RETTEDAL et al., 2015; UC-CACHÓN et al., 2019).

A prevenção, segundo Moreira e colaboradores (2011), é o principal recurso para evitar a colonização dessas bactérias em UTN/UCI, já que o tratamento é difícil devido a sua alta resistência a antimicrobianos.

Por esse fato, deve-se atentar ao monitoramento contínuo das unidades neonatais para a identificação de microrganismos e realização de medidas de prevenção e controle de infecções (CÔRTEZ; BASTOS, 2014).

1.4 *K. PNEUMONIAE* PRODUTORAS DE ESBL

K. pneumoniae, tem sido relatada pela sua importância em surtos hospitalares na década de 90, afetando pacientes de terapia intensiva, na década de 2.000, uma enzima ESBL foi responsável por surtos em enfermarias de hospitais, a CTX-M. *K. pneumoniae* parece não se restringir a poucos antecedentes genéticos, para o desenvolvimento de sua resistência, podendo ser uma emergência múltipla (XERCAVINS et al., 2020).

As Enterobactérias produtoras de ESBL representam uma grande ameaça mundial entre as bactérias resistentes a medicamentos em hospitais e comunidades (CARATTOLI, 2009). As β -lactamases do tipo CTX-M, foram reconhecidos como as ESBLs derivadas da comunidade mais comuns durante a última década (KARANIKI, et al., (2016). Mais de 220 diferentes enzimas CTX-M foram depositadas no GenBank, até o momento. ESBLs do tipo CTX-M foram classificadas em quatro grupos com base em suas semelhanças de sequência de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 e CTX-M-8 / CTX-M- 25 (CHONG; SHIMODA; SHIMONO, 2018). Entre as ESBLs do tipo CTX-M exibindo diversidade de rápido crescimento em genótipos, as variantes mais predominantes atualmente são CTX-M-15, que pertence ao grupo CTX-M-1 encontrado em muitos países em todo o mundo, incluindo o Reino Unido, os Estados Unidos, Canadá, África e Índia (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017).

A família CTX-M, compreende um vasto, complexo e heterogêneo grupo de enzimas representado por seus principais exemplares: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 e CTX-M25 (RODRÍGUEZ et al., 2014), descritas principalmente em isolados de *Salmonella entérica serovar typhimurium* e *E. coli*, além de demais Enterobactérias (SHAIKH et al., 2015); e as enzimas SHV (SHAIKH et al., 2015). Devido ao fato desse mecanismo ser, na maioria das vezes, mediado por plasmídeos, os microrganismos produtores de ESBL, possuem grande importância clínica, uma vez que essa

característica facilita a transmissão horizontal entre as diferentes bactérias. No ambiente hospitalar, a presença de microrganismos produtores de ESBL causa impactos consideráveis na terapia dos pacientes internados e com seu sistema imunológico comprometido, podendo elevar a prescrição a antimicrobianos, devido à minimização das opções terapêuticas (KOBS, 2016; LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010).

A enzima CTX-M15 se tornou uma das ESBLs mais isoladas em todo o mundo (AIRES-DE-SOUSA et al., 2020; GHADDAR et al., 2020). Isolados de *K. pneumoniae* produtora de CTX-M15 estão disseminados em pacientes no ambiente hospitalar e comunidade (DHANJI et al., 2011).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a incidência de patógenos do grupo ESKAPE nas Unidades Neonatais, no período de 2000 a 2019 e caracterizar fenotipicamente e Genotipicamente as Enterobactérias mais frequentes nos anos de 2018 e 2019.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a ocorrência de colonização de neonatos por bactérias do grupo ESKAPE, de 2000 a 2019;
- b) Determinar a densidade de incidência de colonização por microrganismos do grupo ESKAPE de 2000 a 2019;
- c) Avaliar a frequência de patógenos do grupo ESKAPE ao longo dos anos;
- d) Identificar os microrganismos do grupo ESKAPE em culturas de vigilância no período de 2018 a 2019;
- e) Avaliar os mecanismos de resistência dos bacilos Gram negativos do grupo ESKAPE por métodos fenotípicos;
- f) Avaliar curva de incidência de *Enterobactérias* produtoras de ESBL entre 2018-2019;
- g) Identificar as espécies de Enterobactérias produtoras de ESBL mais frequentes que colonizam os recém-nascidos;
- h) Investigar os principais genes de resistência para ESBL em *K. pneumoniae*;
- i) Avaliar a diversidade clonal de *K. pneumoniae* produtora de ESBL.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO

O Hospital Universitário de Londrina é um órgão suplementar da Universidade Estadual de Londrina (HU-UDEL), entidade sem fins lucrativos, que se dedica ao ensino, pesquisa e extensão de serviços à comunidade, pela prestação de atendimento universal. É um hospital terciário, centro de referência para o SUS na região norte do estado do Paraná, Brasil. Atende pacientes de cerca de 250 municípios do Paraná e de mais de 100 cidades de outros estados. Possui atualmente 410 leitos distribuídos entre unidades de internação, pronto socorro e unidades de terapia intensiva (UTI). Referência em gestantes de alta complexidade e alto risco, o hospital disponibiliza 20 leitos neonatais (unidade de tratamento intensivo e cuidados intermediários). A maternidade do HU-UDEL é um serviço de referência para o atendimento a gestações de alto risco. E desta maternidade procedem a grande maioria dos neonatos internados no setor neonatal, composta por uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) e uma Unidade de Cuidados Intermediários Neonatal (UCIN), nos anos de 2000 a 2017 eram subdivididos em três ambientes na unidade: um destinados para os recém-nascidos da UTIN, com 7 leitos oficiais e 3 extras, um para aqueles da UCIN, com 10 leitos oficiais e 9 extras, e um terceiro que pertence também a UTIN com apenas 1 leito, para isolamento de pacientes portadores de MR. A partir de 2018, essas unidades foram reformadas, sendo compostas atualmente por 30 leitos entre UTIN e UCIN.

Os testes descritos nesse trabalho foram realizados no setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas LAC/HU, no laboratório de BIOMOL no LAC/HU.

3.2 DELINEAMENTO

Este estudo foi desenvolvido em duas etapas: na primeira foi realizada uma análise retrospectiva de culturas de vigilância de neonatos internados nas UTINs e UCIs do HU-UDEL entre os anos 2000 a 2019, para determinar a incidência de colonização por patógenos do grupo ESKAPE. Na segunda etapa foi realizado um estudo prospectivo, transversal, no qual foi avaliada a colonização de recém-nascidos internados nas UTINs e UCIs no período de agosto de 2018 a agosto de 2019.

3.3 BIOÉTICA

O primeiro estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética sob o número CAAE: 43013315.8.0000.5231.

O segundo estudo foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos da UEL (CEP/UEL) sob o número CAAE: 154115413.4.0000.5231 obtendo o parecer de número 2.421.361.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os sujeitos para o primeiro estudo foram selecionados a partir dos resultados de todas as culturas de *swab* de vigilância realizadas em recém-nascidos hospitalizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do HU de janeiro de 2000 a dezembro de 2019, sendo utilizados somente uma cultura positiva para cada microrganismo do grupo ESKAPE por paciente para o cálculo de incidência.

Para o segundo estudo foram incluídos todos os neonatos prematuros de baixo peso, internados nas unidades neonatal no hospital de estudo, no período de janeiro de 2018 a agosto de 2019. As coletas de *swab* de vigilância eram realizadas semanalmente após 72 horas de nascimento até o desfecho do recém nascido. Foram incluídas a primeira cultura positiva para microrganismos MR, durante a internação para cada neonato, sendo excluídas a culturas repetidas.

3.5 AMOSTRAS

A frequência de patógenos do grupo ESKAPE, de janeiro de 2000 a dezembro de 2017, foi determinada pela análise retrospectiva dos resultados das culturas de *swabs* de vigilância de recém-nascidos internados nas UTIN e UCI do HU, pela análise do banco de dados do Sistema de Informação AGTA *Healthcare*, módulo LABHOS®, do Laboratório de Análises Clínicas do HU.

Para avaliação do período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019, foram realizadas culturas de vigilância. Foram coletadas *swabs* de vigilância (inguinal/retal), dos recém nascidos após 72 horas de nascimento, as coletas eram realizadas semanalmente. Foram analisadas todas as culturas realizadas no período e incluídas apenas a primeira cultura positiva de cada RN para determinação da frequência dos

microrganismos. Foram considerados patógenos do grupo ESKAPE: *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos (BGN NF-CR), Enterobactérias resistentes a cefalosporinas de terceira e quarta geração (ESBL) e resistentes a carbapenêmicos (CRE).

3.6 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE INCIDÊNCIA

A densidade de incidência de colonização foi obtida pela razão entre o número de casos novos (LABHOS) de patógenos do grupo ESKAPE e o número de pacientes/dia, fornecidos pela divisão de serviço de arquivo médico e estatística, que estiveram internados na UTIN/UCIN, multiplicando-se por 1.000. No período de 2000 a 2019 foram elaboradas as curvas de incidência, ano a ano, de bacilos Gram-negativos produtores de ESBL e CR e dos cocos Gram-positivos. Para o período de 2018 a 2019 foi calculada a densidade de incidência de Enterobactérias, mês a mês, e elaborado um diagrama de controle contendo a incidência de 2018 a 2019, a média de 2016 a 2017, limite de alerta que corresponde à média mais duas vezes o desvio padrão e o limite de controle, média mais três vezes o desvio padrão.

3.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE MICRORGANISMOS DO GRUPO ESKAPE

Para a identificação dos bacilos Gram negativos e cocos Gram positivos, as amostras biológicas contidas nos *swabs* foram inoculadas em caldo TSB (Tryptone Soya Broth) contendo cefotaxima 30mg (CTX) e caldo TSB, contendo 6,5% de cloreto de sódio (NaCl), sendo incubado em estufa microbiológica a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após este período, com auxílio de uma alça bacteriológica, foi retirada uma alíquota de 10 μL , do caldo TSB, que apresentou turvação e inoculada em Ágar Mac Conkey (MC) (Oxoid, Basingstoke, England) e Mannitol Salt Ágar (MSA) (Oxoid, Basingstoke, England), a placa foi incubada a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As colônias que se desenvolveram no MC foram identificadas utilizando-se triagem bioquímica: fermentação de carboidratos, produção de urease, produção de H_2S , desaminação de triptofano, descarboxilação de lisina, arginina e ornitina, produção de indol, utilização de citrato, de acordo com metodologia padronizada por Jorgensen et al. (2015). As colônias amarelas que se desenvolveram no MSA foram identificadas utilizando-se

metodologia manual de acordo com Jorgensen et al. (2015).

A sensibilidade a antimicrobianos foi realizada para determinação dos mecanismos de resistência pelo método de disco difusão, de acordo com CLSI. A produção de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) foi avaliada pelo método de aproximação de discos utilizando-se amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime. Para avaliação da resistência a carbapenêmicos foram utilizados discos de ertapenem, meropenem e imipenem (CLSI et al., 2019). Para a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos para *Staphylococcus aureus*, utilizou-se discos contendo cefoxitina e para VRE discos de vancomicina (HARBARTH et al., 2019), (CLSI et al., 2019). Na sequência as bactérias foram armazenadas a -80°C em meio TSB contendo 30% de glicerol.

3.8 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para realização das análises moleculares, os isolados previamente estocados foram inoculadas em meio TSB para reativação bacteriana. Para tal, utilizou-se uma alíquota do estoque, a qual foi inoculada em 3mL do referido caldo e incubada overnight. Na sequência foi realizada a extração do DNA bacteriano.

3.9 MÉTODOS GENOTÍPICOS

3.9.1 *Extração do DNA*

O DNA foi extraído pelo Kit PureLink Genomic (Invitrogen), as amostras foram crescidas em caldo TSB $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e após crescimento 1mL desta suspensão foi centrifugada a (10.000 rpm por 5 min.), o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido com 180 μL de PureLink Genomic Digestion Buffer mais 20 μL de Proteinase K e incubado a 55°C por 2 horas, após 20 μL de RNase foram adicionados, homogeneizados e incubados por 2 min. a temperatura ambiente (TA), então 200 μL de PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer, foram adicionados e homogeneizados, após 200 μL de etanol 96 – 100% e transferidos para um tubo com coluna (PureLink Genomic Spin Columns) e centrifugados (13.000 rpm por 2 min.), a coluna foi transferida para um tubo novo, 500 μL de Wash Buffer 1 foram adicionado na coluna e centrifugado (13.000 por 2 min.), a coluna foi transferida para um tubo

novo, 500 µL de Wash Buffer 2 foi adicionado na coluna e centrifugado (15.000 por 4 min.), a coluna foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL, foi adicionado 50 µL de PureLink Genomic Elution Buffer e incubada por 1 min. a TA, após foi centrifugada (15.000 rpm por 2 min.), a colula foi descartada e o DNA purificado foi guardado (-20°C).

3.9.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras que apresentaram o teste fenotípico positivo para ESBL foram caracterizadas genotipicamente por PCR, para os seguintes genes, bla-SHV, bla-TEM, bla-CTX-M. Foi utilizado o TopTaq® Master Mix Kit (QIAGEN®), para algumas amostras que apresentaram presença de bandas inespecíficas. Os primers utilizados estão detalhados na Tabela 1. Para as mesmas amostras foi realizada a PCR, baseada em sequências repetidas intergênicas em Enterobacteriaceae (ERIC-PCR), a reação realizada como descrito por Versalovic (1991). As reações de amplificação foram executadas para o volume final de 25 µL com tampão de PCR 1X, dNTP, Taq DNA Polimerase. As reações foram incubadas à 95°C por 1 minuto e em seguida 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 7 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1 e foram utilizados em uma concentração de 50pmol.

3.9.3 Eletroforese

Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,0% em solução de Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x. Na aplicação no gel de agarose foram adicionados 4 µL de tampão de amostra e 6 µL de amostra. A eletroforese foi realizada a 80 volts, por 40 minutos. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Após a corrida o gel foi adicionado à solução de brometo de etídio (0,08 µL/100 mL) por 15 minutos e visualizado em luz ultravioleta (UV). O produto da amplificação do ERIC-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TBE. O aparelho foi ajustado para 100 v e 400 mA, por 210 minutos. A análise foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualização em luz UV.

Tabela 1 – Genes codificadores das enzimas blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, e ERIC, sequência dos oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado e referências

Enzima	Gene	Sequências (5' – 3') F/R	Pb	Referências
TEM	<i>bla-TEM</i>	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	Dallenne et al., (2010)
SHV	<i>bla-SHV</i>	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713	Dallenne et al., (2010)
CTX-M1	<i>bla-CTX-M1</i>	AAAAATCACTGCGCCAGTTC AGCTTATTCATCGCCACGTT	415	Woodford et al., (2005)
CTX-M15	<i>bla-CTX-M15</i>	AAAAATCACTGCGCCAGTTC AGCTTATTCATCGCCACGTT	415	Woodford et al., (2005)
CTX-M2	<i>bla-CTX-M2</i>	CGACGCTACCCCTGCTATT CCAGCGTCAGATTTTTTCAGG	552	Woodford et al., (2005)
CTX-M8	<i>bla-CTX-M8</i>	TCGCGTTAAGCGGATGATGC AACCACGATGTGGGTAGC	666	Woodford et al., (2005)
CTX-M9	<i>bla-CTX-M9</i>	CAAAGAGAGTGCAACGGATG ATTGGAAAGCGTTCATCACC	205	Woodford et al., (2005)
CTX-M25	<i>bla-CTX-M25</i>	GCACGATGACATTCGGG AACCACGATGTGGGTAGC	327	Woodford et al., (2005)
ERIC		AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA		Versalovic et al., (1991)

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos apresentado a seguir, que será submetido a periódico indexado nas principais bases de dados de saúde.

Artigo 1 - Colonização de recém-nascidos por patógenos do grupo ESKAPE: levantamento epidemiológico de 20 anos.

Artigo 2 - Prevalência e caracterização molecular de *Enterobactérias* produtoras de ESBL isoladas de neonatos hospitalizados.

ARTIGO 1 – COLONIZAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS POR PATÓGENOS DO GRUPO ESKAPE: LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE 20 ANOS.

Resumo

Infecções por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, principalmente do grupo ESKAPE, *Enterococcus faecium* (VRE), *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* (MR), *Acinetobacter baumannii* (CR), *Pseudomonas aeruginosa* (CR) e *Enterobacter* (MR), têm se tornado prevalentes nas últimas décadas e constituem um sério problema de saúde pública ao redor do mundo ambiente da terapia intensiva neonatal (UTIN), a internação prolongada de recém-nascidos (RN), o uso extensivo de antimicrobianos e a utilização de procedimentos invasivos, associados à imaturidade do sistema imunológico, constituem fatores de risco para aquisição de microrganismos multirresistentes. O presente estudo teve por objetivo avaliar a epidemiológica de colonização por patógenos do grupo “ESKAPE”, em recém-nascidos, internados em unidades de terapia neonatal, num período de 20 anos. Foram analisados os resultados de culturas de swab de vigilância de janeiro de 2000 a dezembro de 2019, obtidos do sistema de informação do laboratório de microbiologia da instituição do estudo. Foram analisadas todas as culturas realizadas no período e incluídas apenas a primeira cultura positiva de cada RN para determinação da frequência dos microrganismos. Entre os microrganismos multirresistentes mais frequentemente identificados destacam-se os bacilos Gram-negativos (929/1107 – 84,0%). Enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) foram responsáveis pela colonização de 753 (70,0%) RN. A colonização por Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos também foi evidenciada, embora em menor frequência (2,0%). A densidade de incidência média de *Klebsiella pneumoniae* ESBL durante o período foi 2,3/1.000 pacientes-dia, tendo variado de zero em 2000 a cerca de cinco em 2013, 2015, 2018 e 2019. Entre os cocos Gram-positivos os mais frequentes foram *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (11,0%) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (5,0%) das culturas de vigilância. Podemos concluir que a incidência de patógenos do grupo ESKAPE foi elevada nestes 20 anos avaliados, sendo que *K. pneumoniae*, foram os microrganismos que mais frequentemente colonizaram RN. Considerando que a colonização geralmente precede a infecção, e a elevada mortalidade associada a microrganismos multirresistentes, esta frequência elevada do grupo ESKAPE é bastante preocupante e requer medidas efetivas de prevenção e controle.

Palavras-chave: Enterobactérias. Recém nascidos. Resistência a múltiplos fármacos. Beta-lactamases. Cocos Gram positivos.

Introdução

Neonatos internados em unidades de terapia intensiva apresentam elevado risco de desenvolver infecções em função da sua prematuridade, por serem expostos a dispositivos médicos invasivos e por necessitarem de internação prolongada. O uso de antimicrobianos favorece a seleção de microrganismos multirresistentes e a consequente colonização por estes patógenos (CLOCK et al., 2017b; NORDBERG et al., 2018a) .

Dentro deste cenário, um grupo de patógenos multirresistentes designados pelo acrônimo “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e outras Enterobactérias) estão associados a elevadas taxas de morbidade e mortalidade (OLIVEIRA et al., 2020).

Diversos estudos têm indicado a frequência de patógenos multirresistentes em pacientes adultos, mas poucos dados analisaram essa frequência em intervalo de tempo prolongado com a população pediátrica (WEINER et al., 2016). Considerando que o conhecimento da frequência de colonização por microrganismos multirresistentes pode fornecer informações importantes para a implementação de terapia adequada e adoção de medidas de controle. O presente estudo teve por objetivo avaliar a epidemiologia de colonização por microrganismos do grupo “ESKAPE”, em neonatos internados em unidades de terapia intensiva, num período de vinte anos.

Materiais e Metodos

Trata-se de estudo retrospectivo, transversal e descritivo, realizado no setor neonatal de um hospital universitário da região sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019. Em um hospital terciário da rede pública e que atualmente dispõe de 410 leitos (atualizados em 2018). A maternidade do HU-UEL é um serviço de referência para o atendimento a gestações de alto risco. Desta maternidade procede a grande maioria dos neonatos internados no setor neonatal, composto por uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) e uma Unidade de Cuidados Intermediários Neonatal (UCIN) que somam 30 leitos e hospitalizaram 11.736 neonatos ao longo dos 20 anos do estudo.

Resultados de culturas de colonização procedentes de amostras de swabs de vigilância, realizadas previamente, foram avaliadas quanto à presença de *E. faecium* resistentes à vancomicina (VRE), *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *A. baumannii* *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos (BGN NF-CR), Enterobactérias resistentes a cefalosporinas de terceira e quarta geração (ESBL) e resistentes a carbapenêmicos (CRE). Os resultados das culturas foram obtidos do banco de dados do Sistema de Informação AGTA *Healthcare*, módulo LABHOS®, do Laboratório de Análises Clínicas (LAC/HU).

Os microrganismos do grupo ESKAPE foram identificados por metodologia padronizada por Jorgensen et al. (2015) e a sensibilidade a antimicrobianos de acordo com o Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). A determinação da produção de (ESBL) foi avaliada pelo método de aproximação de discos e a resistência a carbapenêmicos foi determinada por disco difusão. Para identificação de MRSA utilizou-se discos contendo cefoxitina e para VRE, discos de vancomicina.

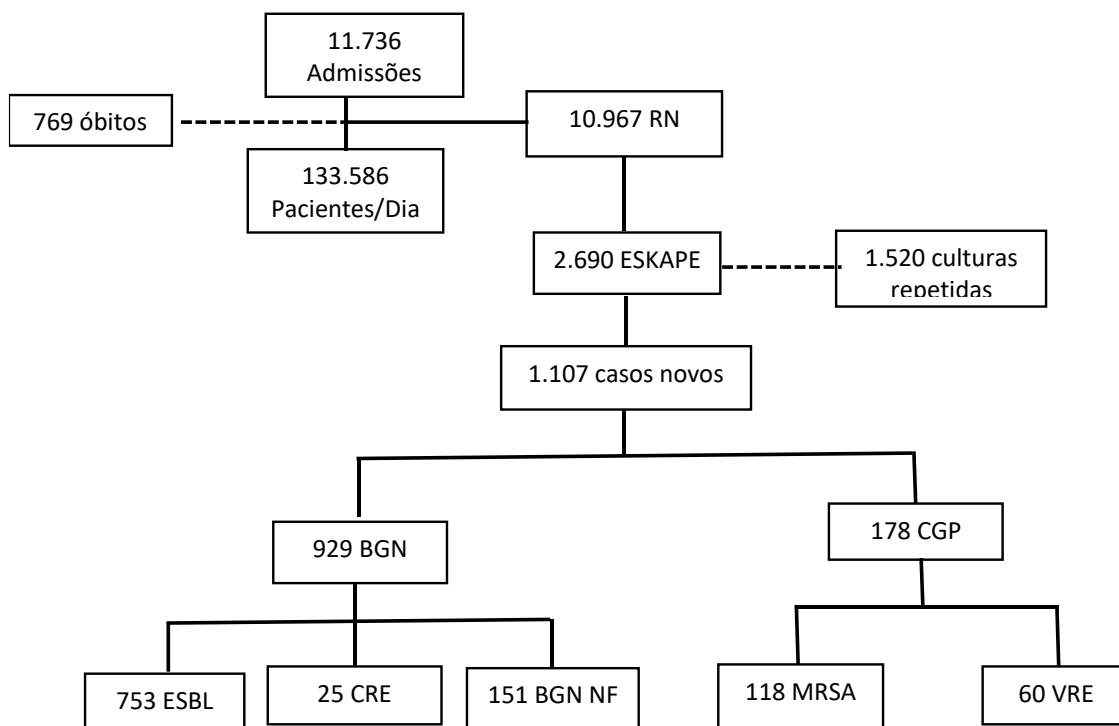
A densidade de incidência de colonização foi obtida pela razão entre o número de casos novos e o número de pacientes-dia que estiveram internados nestas unidades, no mesmo período, multiplicando-se por 1.000, de acordo com o setor de estatística do hospital de referência.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina sob o CAAE número 43013315.8.0000.5231.

Resultados

De janeiro de 2000 a dezembro de 2019, ocorreram 11.736 admissões nas unidades neonatais, com 133.586 pacientes/dia, totalizando 10.967 Recém nascidos, anualmente foram admitidos 2.000 pacientes nas unidades de terapia e cuidados intensivos neonatais. Foram identificados microrganismos do grupo ESKAPE em 2.690 amostras, excluindo as amostras repetidas (1520 repetidos), observamos um número de 1.078 neonatos colonizados por esses patógenos (Figura 2).

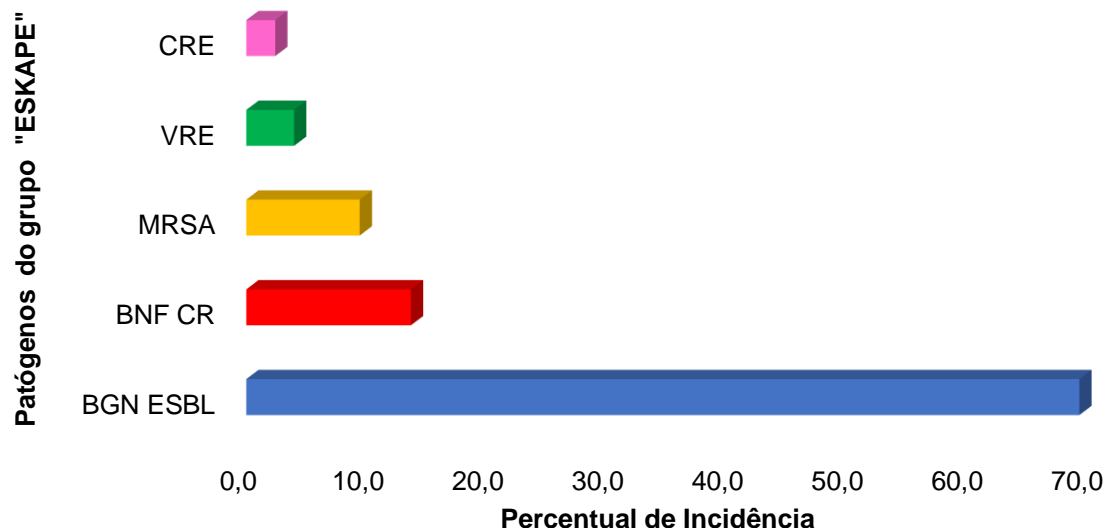
Figura 1 – Fluxograma com números de admissões total, número de admissões por paciente/dia. Número de microrganismos encontrados na colonização de recém nascidos hospitalizados entre os anos de 2000 a 2019



RN: recém Nascido. BGN: bacilos Gram negativos. CGP: cocos Gram positivos. ESBL: beta lactamases de espectro estendido. CRE: *Enterobactérias* resistentes aos carbapenêmicos. BGN NF: BGN não fermentador. MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. VRE: *Enterococcus* resistente à vancomicina.

Os microrganismos Gram-negativos foram os mais prevalentes (926 – 86%), ao longo dos 20 anos de estudo. Entre estas 749 (70%) eram *Enterobactérias* resistentes a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (ESBL), 26 (2,4%) CRE e 148 (14%) BGN NF – CR. As *Enterobactérias* produtoras de ESBL mais frequentes foram *K. pneumoniae* (356) 33%, *Serratia marcescens* (177) 16%, *Enterobacter cloacae* (149) 14% e *Escherichia coli* (49) 4,5%. Os BNF CR investigados, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, foram identificados em (105) 10% e (43) 4% das culturas respectivamente. Entre os microrganismos Gram positivos verificou-se que (102) 10% eram MRSA e apenas (43) 4% eram VRE (Figura 3).

Figura 2 – Percentual de frequência de colonização por patógenos do grupo ESKAPE para 1.078 recém-nascidos internados em UTIN, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019

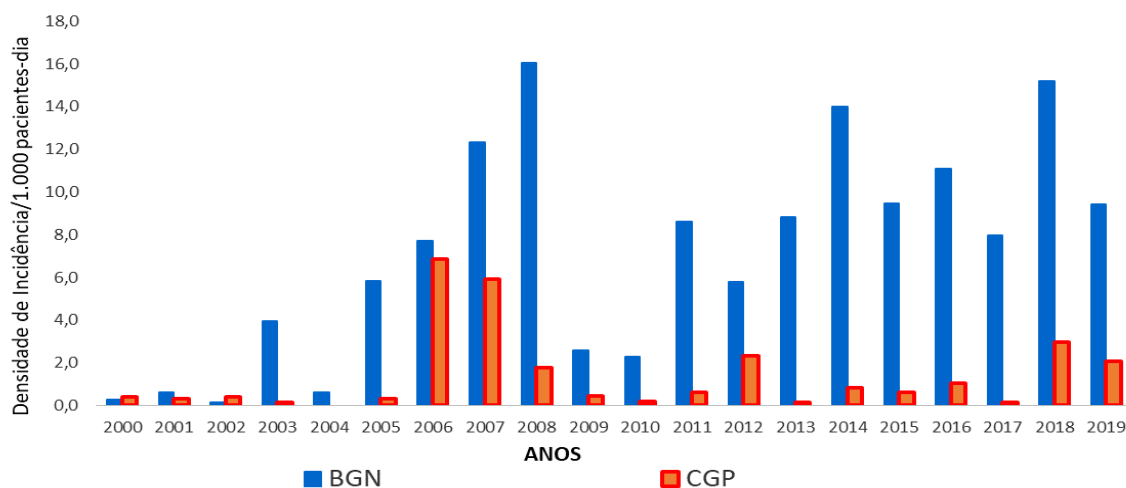


BGN ESBL - bacilos Gram-negativos produtores de β -lactamases de espectro ampliado; BNF CR – bacilos Gram-negativos não fermentadores resistentes a carbapenêmicos; MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, VRE – *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina; CRE – Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos.

Até o ano 2000, a prevalência de microrganismos do grupo ESKAPE era rara na unidade neonatal. Os primeiros relatos de colonização por bacilos Gram-negativos ocorreram em 2001. A partir de então, até 2019 verifica-se uma tendência ascendente na incidência de microrganismos Gram-negativos multirresistentes ao longo dos anos, embora tenham ocorrido algumas flutuações durante o período. A densidade de incidência média de colonização, de 2000 a 2019, foi de 7,6 bacilos Gram-negativos por 1.000 pacientes-dia, tendo aumentado até 16 em 2008, reduzido para 5,8 em 2012, voltando a subir para 14 em 2014 e 15,2 em 2018.

Já para cocos Gram-positivos a densidade de incidência média foi de 1,5/1.000 pacientes-dia. Os maiores índices foram verificados em 2006 (6,8) e 2007 (5,9), diminuindo ao longo dos anos, com oscilações em 2012, 2018 e 2019. Uma vez que os bacilos Gram negativos entram nas unidades, eles competem com os cocos Gram positivos. Assim os bacilos Gram negativos, tiveram seu primeiro pico em 2003, continuou em alta ao longo dos anos com diminuição em 2004, 2009 e 2010, com alto índice de densidade de incidência em 2008 (16,0 DI) e 2018 (15,2 DI), ultrapassando limite de controle e de alerta, evidenciando um surto. Esses resultados para os BGN foram às custas das Enterobactérias (Figura 4).

Figura 3 – Densidade de incidência de colonização por bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos do grupo ESKAPE, isolados de recém-nascidos internados em UTN de um hospital do sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019



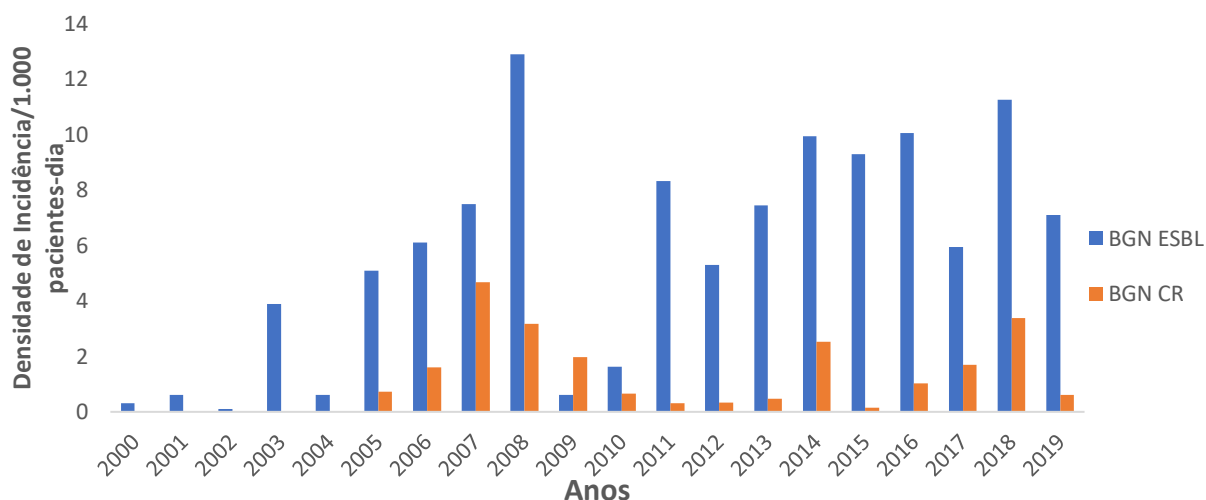
BGN - bacilos Gram-negativos; CGP – cocos Gram-positivos.

A densidade de incidência de resistência a carbapenêmicos em bacilos Gram-negativos foi 1,2/1.000 pacientes-dia. Porém a densidade para BGN ESBL, foi de 15,0/1000 pacientes-dia em 2008, tendo uma diminuição nos anos seguintes, voltando a subir em 2014 e 2018. Mostrando oscilações durante os anos.

Em 2007, foi a maior densidade de incidência para os BGN CR, os microrganismos envolvidos eram *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, com densidades menores nos anos seguintes (Figura 5).

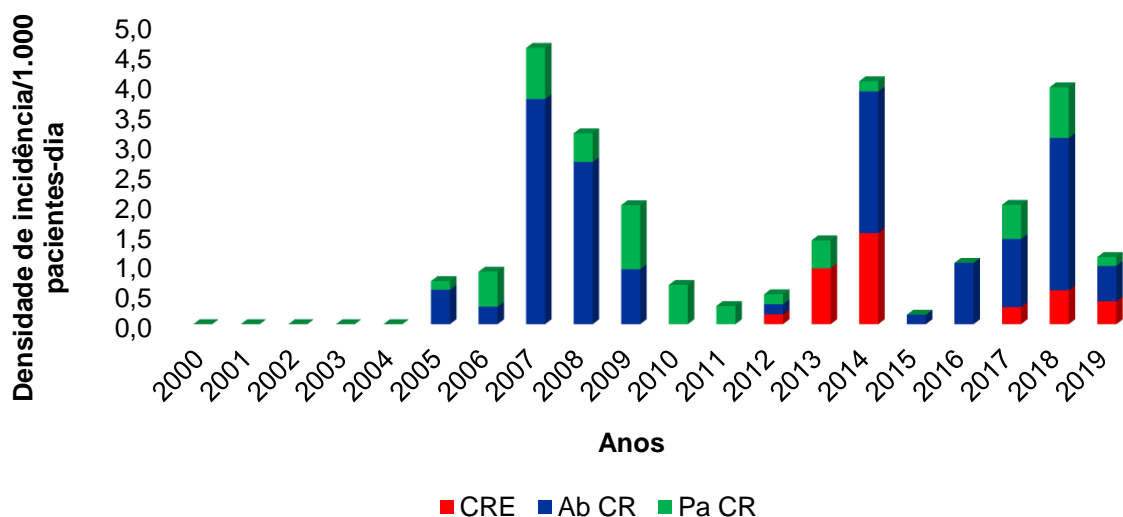
Em relação às espécies dos microrganismos, entre 2005 e 2011 os microrganismos CR se restringiam a bacilos não fermentadores, sendo que entre 2007 e 2009, em 2014 e em 2018 ocorreram surtos por *A. baumannii*. Os primeiros relatos de CRE foram identificadas inicialmente em 2012 com densidade de incidência de 0,2/1.000 pacientes-dia, cuja espécie mais frequentemente isolada foi *K. pneumoniae*. Em 2014 ocorreu o primeiro surto por CRE quando a densidade de incidência chegou a 1,5/1.000 pacientes-dia. Entre 2015 e 2016 nenhum caso novo foi identificado, voltando a surgir em 2017 (Figura 6).

Figura 4 – Densidade de incidência de colonização por bacilos Gram-negativos produtores de ESBL e resistentes a carbapenêmicos, isolados de recém-nascidos internados em UTIN de um hospital do sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro



BGN ESBL- Bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases de espectro ampliado; BGN CR – Bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenêmicos.

Figura 5 – Densidade de incidência de colonização de bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenêmicos, isolados de recém-nascidos internados em UTN de um hospital do sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019

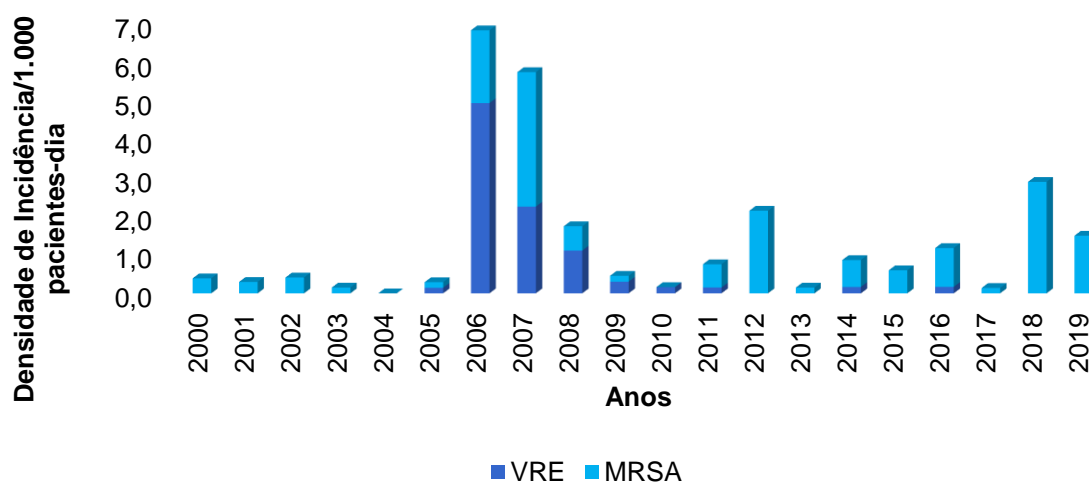


CRE – Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos; Ab CR – *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos; Pa CR – *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos.

Quanto aos cocos Gram-positivos do grupo ESKAPE, verifica-se que ocorreu um surto por VRE de 2006 a 2008, tendo a densidade variado de 5 a 1,2. Com exceção deste período a densidade de incidência média de VRE foi de 0,12. Após 2012, a frequência deste patógeno reduziu progressivamente mantendo-se praticamente nula

até 2019. A incidência de MRSA variou de 0,4 no ano 2000 a 3,5 em 2007, evidenciando um surto nesse período. Posteriormente verificou-se redução na incidência de *S. aureus* multirresistentes, mantendo-se em média em 0,66/1.000 pacientes-dia até 2018, quando voltou a subir para 2,9 (Figura 7).

Figura 6 – Densidade de incidência de colonização por cocos Gram positivos do grupo ESKAPE, isoladas de recém-nascidos internados em UTN de um hospital do sul do Brasil, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2019



VRE – *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina; MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

Discussão

O presente estudo evidenciou uma elevada frequência de colonização por patógenos do grupo “ESKAPE” em RN, nos últimos 20 anos. A tendência de aumento na densidade de incidência foi impulsionada pela disseminação de enterobactérias produtoras de ESBL, em especial por *K. pneumoniae*.

A frequência e a diversidade de espécies envolvidas diferem de acordo com a região e a ocorrência de surtos. No geral, estudos realizados na última década têm evidenciado um aumento na prevalência de bacilos Gram-negativos multirresistentes colonizando recém-nascidos internados em UTN ao redor do mundo (BAIER et al., 2019; LEIKIN-ZACH et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; ROBERTS et al., 2019).

Dados da Rede Nacional de Segurança da Saúde Americana (*National Healthcare Safety Network – NHSN*), referentes aos anos 2015 a 2017, apontam as bactérias do grupo ESKAPE como os patógenos mais comuns em Infecções

Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), nos Estados Unidos. *S. aureus* foi responsável por 15,4% das infecções seguido por *E. coli* (12,3%), *K. pneumoniae* (9,3%), *Enterococcus* spp. (8,7%), *Enterobacter* spp. (8,5%) e *P. aeruginosa* (5,8%) (WEINER-LASTINGER et al., 2020). No nosso estudo, ao contrário, a frequência de bactérias do grupo ESKAPE foi maior (76%) para as Gram-negativas como *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *S. marcescens*.

Numa revisão sistemática realizada por Folgori et al. (2018), que incluiu 6.363 neonatos, verificou-se que 1.825 (28,7%) foram colonizados e que 157 (7,9%) desenvolveram infecção de corrente sanguínea por bacilos Gram-negativos. No presente estudo, da mesma forma, a maioria dos microrganismos que colonizaram os RN eram bacilos Gram-negativos resistentes a cefalosporinas de quarta geração.

O Brasil e os países latino-americanos e outros países em desenvolvimento, em geral, têm níveis mais elevados de resistência bacteriana em comparação com os da Europa e Estados Unidos, especialmente entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores e *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (GHADDAR et al., 2020; MARRA et al., 2011; NORDBERG et al., 2018a; SILVA, 2016).

A produção ESBL por *E. coli* e *K. pneumoniae* isolados a partir de países da América Latina é um problema bem reconhecido responsável pelas altas taxas de resistência de amplo espectro a cefalosporinas (BEREZIN; SOLÓRZANO, 2014).

Da mesma forma, no Paquistão, num estudo realizado com neonatos saudáveis da comunidade, a colonização bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL também foi elevada. No entanto, ao contrário do nosso estudo onde os RN foram colonizados preferentemente por *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *Enterobacter* spp., a espécie mais frequente foi *E. coli* (84%), enquanto *K. pneumoniae* foi identificada em 10% dos isolados e *Enterobacter* spp. em 6% (SALEEM et al., 2020). Uma possível explicação seria o fato de nossos isolados serem de origem hospitalar.

Estudos realizados na Europa têm reportado índices menores de bacilos gram-negativos multirresistentes. Na Itália, Giuffrè et al. (2016a) relataram taxas de colonização por bacilos Gram-negativos de 28%. Na Alemanha, numa avaliação retrospectiva conduzida por Haase et al. (2014), verificou-se que 4,9% dos recém-nascidos desenvolveram infecções associadas a algum MR do grupo ESKAPE. A densidade de incidência de colonização por enterobactérias MR verificada nesse estudo foi de 3,5/1.000 pacientes-dia, no ano 2012, menor do que a identificada em nosso estudo, embora também tenha apresentado uma tendência de aumento ao

longo do período. Embora em taxas menores do que as nossas, Baier et al. (2019), em outro estudo alemão, relataram que as bactérias gram-negativas foram mais frequentes (26%).

O surgimento e disseminação de resistência a carbapenêmicos tem sido evidenciada como uma tendência global e são variáveis de acordo com o local e período de estudo (FOLGORI et al., 2018; SALEEM et al., 2020). Roberts et al. (2019) avaliaram 97 recém-nascidos na Tailândia e identificaram resistência em 57% dos *A. baumannii* e 52% das *K. pneumoniae*, índices superiores aos verificados em nossa pesquisa. *K. pneumoniae* produtoras de KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) foi relatado pela primeira vez em 2008 em recém-nascidos em Karachi, Paquistão e em 2011, 72% dos isolados de *K. pneumoniae* eram resistentes aos carbapenems (SALEEM et al., 2020). No presente estudo, os primeiros isolados de BGN CR foram identificados em *A. baumannii* e *P. aeruginosa* no ano 2005. Foi só a partir de 2012 que foram identificadas CRE, entre elas *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*. No entanto, nossos dados indicam uma frequência menor do que a verificada em outros países.

Entre os cocos Gram-positivos do grupo ESKAPE, *S. aureus* é um dos principais agentes etiológicos de infecção em todo o mundo e um patógeno hospitalar bem conhecido em pacientes em neonatologia. Vários estudos demonstraram que a colonização neonatal com MRSA é um fator de risco para subsequente desenvolvimento de infecção (LYLES et al., 2016).

Na Europa dados publicados pelo Centro Europeu de Controle de Doenças (*European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC*), referentes ao ano 2018, evidenciam que a prevalência de média de MRSA em IRAS é relativamente baixa, mas variável de 0%, na Islândia, a 43%, na Romênia (ECDC, 2019). Estudos realizados em unidades neonatais na Alemanha encontraram frequências muito baixas de MRSA em neonatos (BAIER et al., 2019; HAASE et al., 2014). Nossos dados foram bem variáveis durante o período de análise. Em 2007 foi quando identificamos a maior densidade de incidência de MRSA/1.000 pacientes-dia. A partir de então essas taxas permaneceram baixas na maior parte do tempo.

Assim como para MRSA, a frequência de VRE também tem sido relatada em frequências variáveis em unidades neonatais e relacionada a surtos (ANDERSSON et al., 2019; DIAS; SALEEM, 2019; GOLAN et al., 2005; MAROM et al., 2020). Tendências crescentes de *E. faecium* resistentes à vancomicina de 10,5% em 2015

para 17,3% em 2018 em sido uma preocupação em hospitais europeus, enfatizando a necessidade de um monitoramento rigoroso para entender melhor a epidemiologia, diversidade clonal e fatores de risco associados para infecção (ECDC 2019).

Ao contrário dos estudos realizados em hospitais alemães, nos quais VRE não foram detectados durante todo o período do estudo, no nosso hospital ocorreu um surto na UTN, no ano 2005. Dados de um estudo realizado previamente, pelo nosso grupo de pesquisa, publicados por Perugini et al., (2011), evidenciaram um surto por VRE relacionado à contaminação ambiental, ocorrido entre os anos 2004 e 2007, nas unidades de terapia intensiva de pacientes adultos.

A utilização de culturas de vigilância em UTN tem sido apontada como intervenção simples na tentativa de conter surtos em diversos estudos (HEINRICH et al., 2011; HUANG, et al., 2002;). A prevenção, segundo Moreira et al. (2011), é o principal recurso para evitar a colonização dessas bactérias em UTN/UCI, já que o tratamento é difícil devido a sua alta resistência a antimicrobianos.

Por esse fato, deve-se atentar ao monitoramento contínuo das unidades neonatais para a identificação de microrganismos e realização de medidas de prevenção e controle de infecções (CÔRTEZ; BASTOS, 2014).

Conclusão

Os microrganismos do grupo ESKAPE, apresentaram uma elevada tendência epidemiológica na colonização de recém nascidos hospitalizados, com prevalência para os bacilos Gram-negativos. As enterobactérias produtoras de ESBL, particularmente *K. pneumoniae* foram os microrganismos que mais frequentemente colonizaram recém-nascidos internados nas unidades de terapia e cuidados intensivos neonatais. Verifica-se ainda uma flutuação nestas taxas, provavelmente relacionadas a surtos que ocorreram ao longo dos anos.

A adoção de práticas rigorosas de prevenção e controle de infecções, incluindo higiene das mãos, a utilização de equipamentos de proteção individuais adequados, a diminuição do uso de dispositivos invasivos, o controle de antimicrobianos, as culturas de vigilância e os cuidados com o ambiente e equipamentos e o treinamento contínuo da equipe colaboraram para a redução de colonização por microrganismos do grupo ESKAPE.

Referências

ANDERSSON, P. et al. Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) outbreak in a neonatal intensive care unit and special care nursery at a tertiary-care hospital in Australia - A retrospective case-control study. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 40, n. 5, p. 551–558, maio 2019.

BAIER, C. et al. Prospective surveillance of bacterial colonization and primary sepsis: findings of a tertiary neonatal intensive and intermediate care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 102, n. 3, p. 325–331, 2019.

BEREZIN, E. N.; SOLÓRZANO, F. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 942–953, ago. 2014.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1–22, 2020.

CLOCK, S. A. et al. Infant colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant enterococci preceding neonatal intensive care unit discharge. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. e144–e148, 2017a.

CLOCK, S. A. et al. Colonization with antimicrobial-resistant Gram-negative bacilli at neonatal intensive care unit discharge. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. 219–226, 2017b.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100**. 27. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M02-A12**. 35. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

DE OLIVEIRA, P. M. N. et al. Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–7, 2019.

DIAS, M.; SALEEM, J. Surface colonization and subsequent development of infections with multi drug resistant organisms in a neonatal intensive care unit. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2019.

ECDC. **Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018**. Stockholm: [s.n.].

FOLGORI, L. et al. The relationship between Gram-negative colonization and bloodstream infections in neonates: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 251–257, 2018.

FOLGORI, L.; BIELICKI, J. Future Challenges in Pediatric and Neonatal Sepsis: Emerging Pathogens and Antimicrobial Resistance. **Journal of Pediatric Intensive Care**, v. 08, n. 01, p. 017–024, mar. 2019.

GHADDAR, N. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Produced by Escherichia coli Colonizing Pregnant Women. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2020, p. 1–7, jan. 2020.

GIUFFRÈ, M. et al. The Increasing Challenge of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. **Medicine**, v. 95, n. 10, p. e3016, mar. 2016.

GOLAN, Y. et al. Transmission of vancomycin-resistant Enterococcus in a neonatal intensive care unit. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, n. 6, p. 566–567, jun. 2005.

HAASE, R. et al. Colonization and Infection due to Multi-resistant Bacteria in Neonates: A Single Center Analysis. **Klinische Pädiatrie**, v. 226, n. 01, p. 8–12, out. 2014.

JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 11. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2015.

LEIKIN-ZACH, V. et al. Neonatal Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in the Neonatal Intensive Care Unit. **The Israel Medical Association journal : IMAJ**, v. 20, n. 5, p. 286–290, 2018.

LIN, J. et al. A prospective cohort study of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage in neonates: The role of maternal carriage and phenotypic and molecular characteristics. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 555–565, 2018.

LYLES, R. D. et al. Regional Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Among Critically Ill Children in a State With Mandated Active Surveillance. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 5, n. 4, p. 409–416, dez. 2016.

MAROM, R. et al. A silent outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in a neonatal intensive care unit. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 87, dez. 2020.

MARRA, A. R. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, maio 2011.

NORDBERG, V. et al. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a 5-year follow-up study. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 10–15, 2018.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, n. May, p. 1–84, 2016.

OLIVEIRA, D. M. P. DE et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 1–49, 2020.

ROBERTS, T. et al. Antimicrobial-resistant Gram-negative colonization in infants from a neonatal intensive care unit in Thailand. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 2, p. 151–155, out. 2019.

SAKAI, A. M. et al. Colonization by multidrug-resistant microorganisms of hospitalized newborns and their mothers in the neonatal unit context. **Journal of infection in developing countries**, v. 14, n. 7, p. 765–771, 2020.

SALEEM, A. F. et al. The Gut of Healthy Infants in the Community as a Reservoir of ESBL and Carbapenemase-Producing Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 286, maio 2020.

SHIRAI, Y. et al. Neonatal methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization and infection. **Journal of Neonatal-Perinatal Medicine**, v. 10, n. 4, p. 439–444, 2017.

SILVA, D. M. DA. **Perfil de susceptibilidade e prevalência de bactérias do grupo ESKAPE em um hospital público do Distrito Federal**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE CEILÂNDIA, 2016.

SIMON, A.; TENENBAUM, T. Surveillance of Multidrug-resistant Gram-negative Pathogens in High-risk Neonates—Does it Make a Difference? **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 4, p. 407–409, abr. 2013.

TURNER, P. et al. High prevalence of antimicrobial-resistant gram-negative colonization in hospitalized cambodian infants. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 8, p. 856–861, 2016.

VERSPORTEN, A. et al. Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 381–387, maio 2014.

WEINER-LASTINGER, L. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with pediatric healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 19–30, jan. 2020.

WEINER, L. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288–1301, nov. 2016.

WHO. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report**. Geneva, World Health Organization. [s.l: s.n.].

ARTIGO 2 – PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL ISOLADAS DE NEONATOS HOSPITALIZADOS

Resumo

A emergência e a disseminação de microrganismos produtores de ESBL têm sido retratadas como grande problema de saúde pública, especialmente no que diz respeito a patógenos associados as IRAS. Os neonatos constituem um grupo de alto risco para a colonização por microrganismos MR, devido a sua imaturidade imunológica, vários procedimentos invasivos, tempo de internação prolongado e uso de antimicrobianos. A colonização do recém-nascido aumenta o risco para o desenvolvimento de infecções. Esse estudo teve como objetivo, avaliar a incidência da colonização por Enterobactérias produtoras de ESBL em neonatos hospitalizados em Unidades neonatais nos anos de 2018 e 2019, e realizar a identificação fenotípica e genotípica para as espécies mais prevalente. Trata-se de um estudo prospectivo, transversal, realizado investigação da frequência de colonização por Enterobactérias MR em recém-nascidos internados em unidade neonatal. Foram incluídos todas as culturas positivas de vigilância para Enterobactérias MR e excluídas as repetidas para cada neonato. Sendo utilizadas para os cálculos de incidência a primeira cultura positiva para o paciente. A maior prevalência entre as Enterobactérias identificadas foi de *Klebsiella pneumoniae* ESBL (51%). Na avaliação genotípica para as enzimas ESBL, as mais frequentemente encontradas foram TEM (68%), SHV (63%) e CTX-M1/M15 (95%). Em muitas dessas amostras foram identificadas mais de uma enzima associada a resistência antimicrobiana. Os isolados de *K. pneumoniae* mostraram serem similares em 85%, evidenciando um mesmo clone na colonização dos RN, durante o período de estudo.

Palavras-chaves: Enterobactérias. Recém nascidos. Colonização. Internação. ESBL. Resistência a múltiplos fármacos. Genes de resistência.

Introdução

Neonatos internados em Unidades de Terapia e Cuidados Intensivos Neonatais, apresentam elevado risco de desenvolver infecções, pela sua prematuridade, exposição a dispositivos médicos invasivos e por necessitarem de internação prolongada (CLOCK et al., 2017; V. NORDBERG et al., 2018).

As ESBLs têm a capacidade de inativar penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de amplo espectro, são disseminadas por plasmídeos entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes. Em países em desenvolvimento, onde a principal etiologia da sepse neonatal são as enterobactérias, esse mecanismo de resistência torna-se importante devido às implicações desfavoráveis na morbidade e mortalidade neonatal (LONA-REYES et al., 2019).

As Enterobactérias produtoras de ESBL representam uma grande ameaça mundial entre as bactérias resistentes a medicamentos em hospitais e comunidades. ESBLs estão frequentemente localizados em grandes plasmídeos que também abrigam genes resistentes a outras classes de antimicrobianos, resultando em isolados multirresistentes (NAAS et al., 2016).

Na última década, microrganismos multirresistentes (MR) surgiram como patógenos importantes que causam sepse nas unidades neonatal, incluindo Enterobactérias ESBL (MULEY; GHADAGE; BHOORE, 2015). Yusef et al., (2018), observaram um aumento nos episódios de sepse devido a microrganismos MR na UTIN nos últimos anos, e esse aumento foram associados a alta mortalidade, especialmente em bebês prematuros.

Um aumento global no número de infecções por bactérias Gram-negativas MR em neonatos, particularmente em ambientes com poucos recursos vem sendo observado ao longo dos anos (AGARWAL et al., 2016). A colonização desses microrganismos, especialmente *K. pneumoniae* e *Escherichia coli*, está associado a infecções neonatais da corrente sanguínea de início tardio (FOLGORI et al., 2018). Pacientes colonizados por bacilos Gram-negativos MR, podem transmiti-los para outros pacientes, ocasionando sua preexistência no ambiente (MOSHIRI; MAHIDA; SOO, 2018). Enterobactérias produtoras de ESBL e de carbapenemases têm sido associadas a infecções de difícil tratamento, ao aumento do tempo de hospitalização e risco de mortalidade (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016).

Em estudo realizado por Martin e Bachman (2018), observaram associação significativa entre a colonização retal de *K. pneumoniae* e subsequente infecção. Houve alta concordância entre isolados colonizadores e isolados infectantes subsequentes, particularmente para pneumonia e Infecção do Trato Urinário (ITU), esses resultados indicam a colonização como uma etapa crítica na patogênese das infecções adquiridas em hospitais.

A pesquisa de recém nascidos colonizados, em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, apresenta grande valor para minimizar os riscos de infecção, uma vez que são pacientes críticos e possuem sistema imunológico imaturo. O objetivo deste estudo foi caracterizar os mecanismos de resistência aos antimicrobianos de Enterobactérias MR, colonizantes de recém nascidos hospitalizados nos anos de 2018 e 2019.

Materiais e Métodos

Trata-se de um estudo prospectivo, transversal, realizado no período de 2018 a 2019. Foi investigada a frequência de colonização por Enterobactérias MR em recém-nascidos internados em unidade neonatal de um hospital terciário da região sul do Brasil. O hospital pertence à rede pública, e dispõe de 410 leitos, sendo 30 destinados para unidades neonatais.

Foram incluídos todas as culturas positivas de vigilância para Enterobactérias MR e excluídas as repetidas para cada neonato. Sendo utilizadas para os cálculos de incidência a primeira cultura positiva para o paciente.

A coleta aconteceu entre os neonatos elegíveis, semanalmente, após 72 horas de nascimento. Todos os neonatos nascidos e internados no setor de cuidados intensivos e intermediários neonatal foram incluídos no estudo. Foram excluídos somente aqueles cujo responsável legal não aceitou participar da pesquisa.

Para a investigação de colonização foram coletadas amostras de vigilância. As amostras foram obtidas girando-se o *swab*, delicadamente nas regiões inguinal e retal. Introduzidos em meio de transporte Stuart, que foram encaminhados ao laboratório de microbiologia LAC/HU), no prazo máximo de 2 horas.

As amostras contidas nos swabs foram inoculadas em caldo TSB (Tryptone Soya Broth) contendo 8µg/mL de cefotaxima, para pesquisa de bacilos Gram-negativos. Após incubação overnight em estufa microbiológica a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24

horas, as amostras foram inoculadas em agar MacConkey contendo 8 µg/mL de cefotaxima. Foram considerados bacilos Gram-negativos multirresistentes as Enterobacterias produtoras de ESBL e resistentes a carbapenêmicos (CRE), e os bacilos Gram-negativos não fermentadores como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos (CR).

A identificação dos microrganismos foi realizada fenotipicamente por metodologia manual, utilizando-se testes bioquímicos de acordo com metodologia padronizada por Jorgensen et al. (2015).

A sensibilidade a antimicrobianos foi realizada para determinação dos mecanismos de resistência pelo método de disco difusão, de acordo com CLSI (2019).

Foi incluído a primeira cultura positiva para cada neonato. A densidade de incidência de colonização foi obtida pela razão entre o número de casos novos de Enterobactérias MR e o número de pacientes-dia que estiveram internados nos setores de cuidados intensivos e intermediários, no mesmo período, multiplicando-se por 1.000.

Para construção do diagrama de controle foi calculada a densidade de incidência, mês a mês, do período 2018 a 2019, a média da incidência dos dois anos anteriores (2016 – 2017), o limite de alerta (média mais duas vezes o desvio padrão da média) e o limite de controle (média mais três vezes o desvio padrão).

A frequência de genes de resistência a β-talactâmicos foi investigada para isolados de *K. pneumoniae* identificados entre agosto de 2018 e agosto de 2019, que apresentaram teste fenotípico positivo para ESBL pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

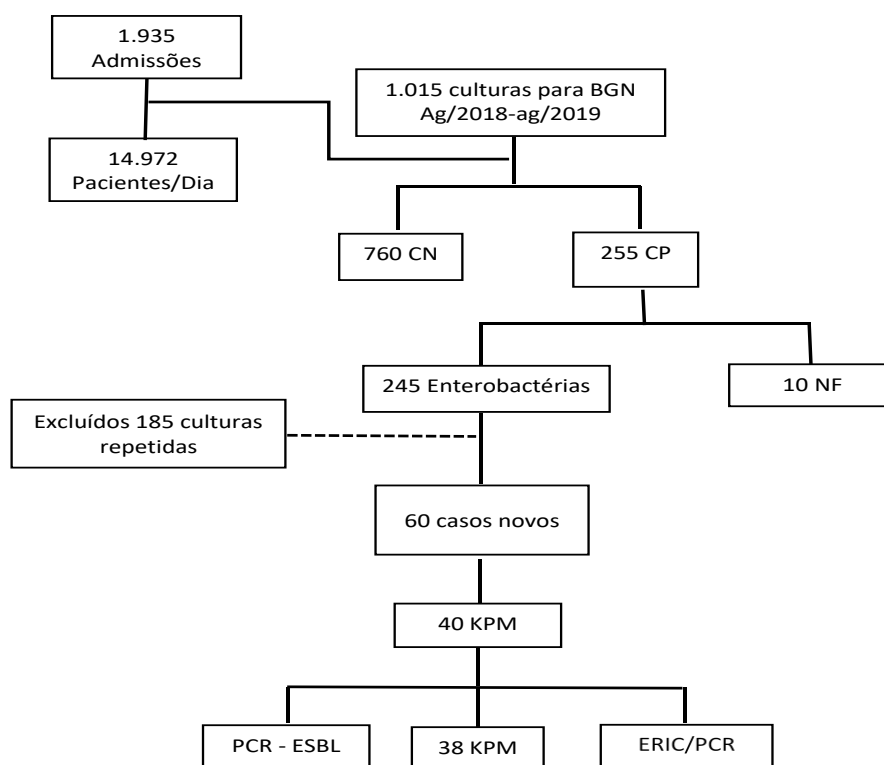
A pesquisa para avaliar a presença de ESBL foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene bla_{-SHV} e bla_{-TEM} (DALLEENNE et al., 2010), genes bla_{-CTX-M} (WOODFORD et al., 2005) e Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Os produtos foram corados com brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e observados sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos foram primeiro normalizados de acordo com o peso molecular dos marcadores de DNA e, em seguida, os padrões de banda foram categorizados usando o software BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, versão 6.5), com tolerância de posição de 2%. As amostras foram submetidas a análises de similaridade por meio do algoritmo UPGMA com o coeficiente de Jaccard.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina sob o CAAE número 154115413.4.0000.5231.

Resultados

Em 2018 e 2019, foram registradas 1.935 admissões de recém nascidos internados nas unidades neonatal, um total de 14.972 pacientes/dia. Foram realizadas 1.693 culturas de vigilância para a pesquisa de bacilos Gram-negativos, dessas 396 foram culturas positivas, sendo 356 Enterobactérias, de acordo com o fluxograma (Figura 8). Foram excluídas as culturas repetidas para cada paciente. Identificando 172 bacilos Gram-negativos, destes 143 (83%) eram Enterobacterias. Entre as Enterobacterias 136 eram produtoras de ESBL e 7, resistentes a carbapenêmicos (CRE).

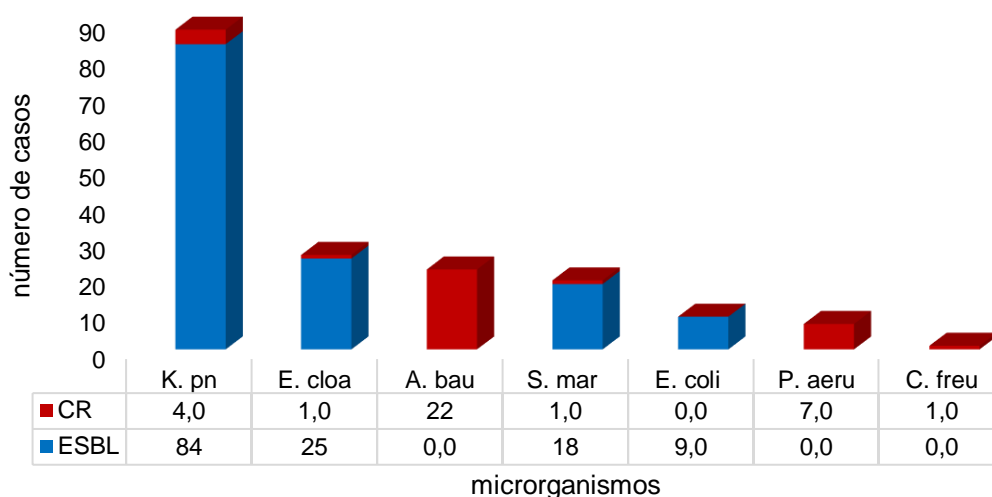
Figura 7 – Fluxograma: número de admissões de recém nascidos internados em setor neonatal, número de pacientes/dia, número de microrganismos isolados, entre agosto de 2018 a agosto 2019



BGN: bacilos Gram negativos. CN: Cultura Negativa. CP: Cultura Positiva. NF: não fermentador. KPM: Klebsiela pneumoniae. PCR: reação em cadeia da polimerase. ESBL: beta lactamase de espectro estendido.

As espécies de Enterobacterias identificadas mais frequentemente foram *K. pneumoniae* (88/172 – 51%), *E. cloacae* (26/172 – 15%) e *S. marcescens* (19/172 – 11%) (Figura 9).

Figura 8 – Distribuição da frequência de bacilos Gram negativos multirresistentes (n=172) identificados em culturas de vigilância de neonatos, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019



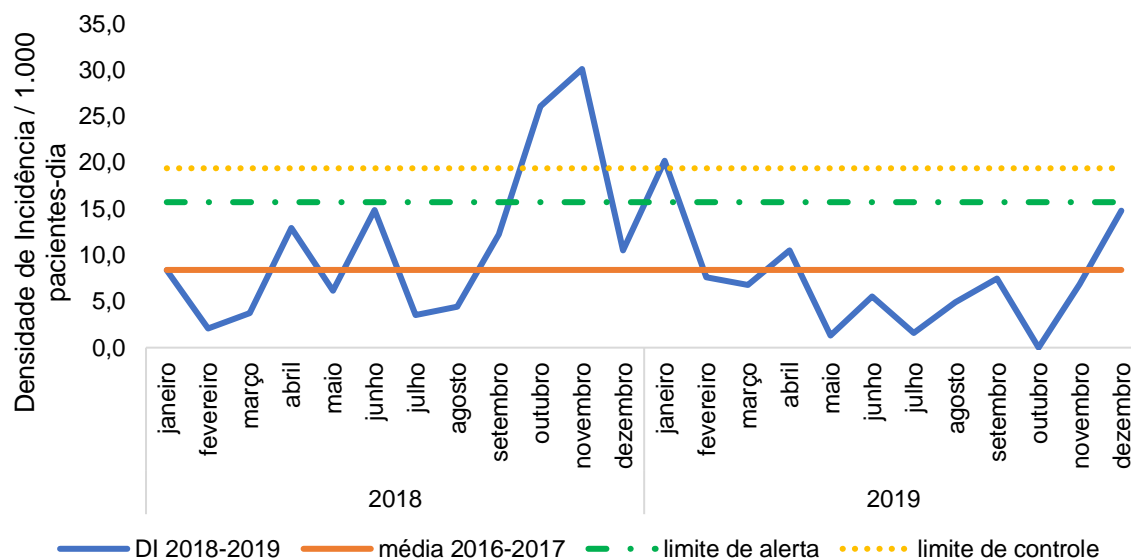
K. pn: *Klebsiella pneumoniae*. E. cloa: *Enterobacter cloacae*. A. bau: *Acinetobacter baumannii*. S. mar: *Serratia marcescens*. E. coli: *Escherichia coli*. P. aeru: *Pseudomonas aeruginosa*. C. freu: *Citrobacter freundii*.

A densidade de incidência média das Enterobactérias foi 9,4/1.000 pacientes-dia, no período de 2018 a 2019, superior à média do período de 2016 a 2017 (8,4). A incidência de Enterobactérias multirresistentes chegou a 26,1 em outubro e a 30,1/1.000 pacientes-dia em novembro, caracterizando a ocorrência de um surto. A partir de fevereiro de 2019 a frequência de Enterobactérias reduziu-se abaixo da média, progressivamente até outubro, ultrapassando a média novamente em dezembro (Figura 10).

De acordo com a distribuição das três espécies de Enterobactérias mais frequentes, mês a mês, a elevação da densidade de incidência ocorreu devido a *K. pneumoniae* (Figura 11).

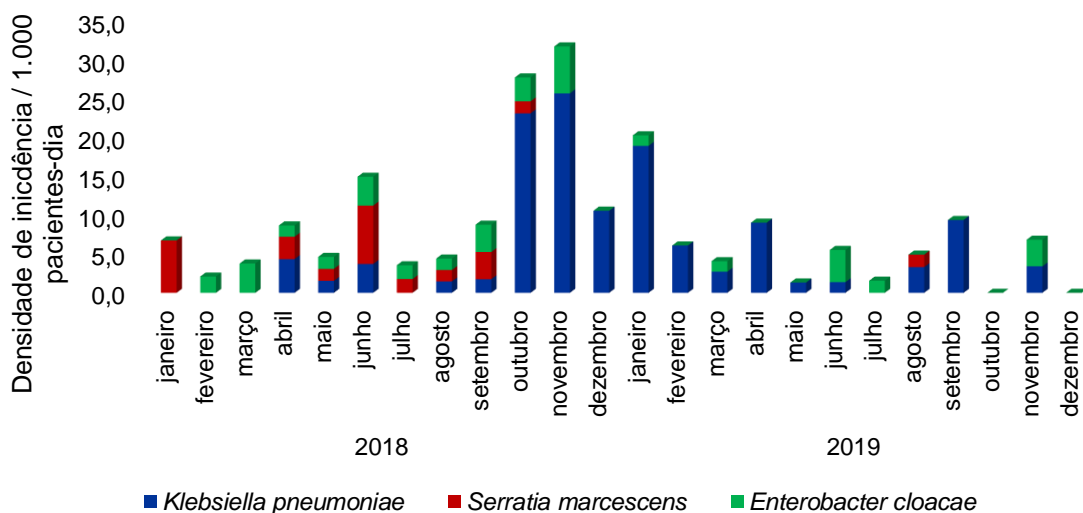
Nas culturas de vigilância, as Enterobactérias foram as mais frequentes (143/172–83%), sendo que 95% eram produtoras de ESBL e 4% resistentes a carbapenêmicos (CRE).

Figura 9 – Diagrama de controle de Enterobactérias isoladas de culturas de swabs retal de neonatos, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019



DI: Densidade de incidência.

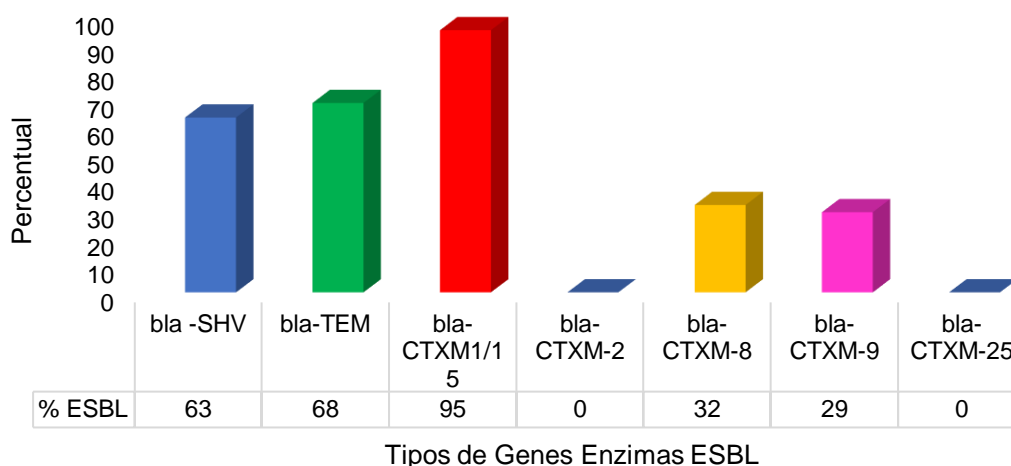
Figura 10 – Densidade de incidência de colonização por *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*, produtores de ESBL, isolados de culturas de vigilância, por 1.000 neonatos-dia, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019



Encontramos uma alta incidência de *Klebsiella pneumoniae* nos isolados dos Recém-nascidos, a partir das amostras identificadas fenotipicamente para ESBL. Foi realizada análise genotípica para identificação das principais enzimas ESBL e a similaridade clonal da *K. pneumoniae*, através de ERIC-PCR.

A resistência de 38 amostras de *K. pneumoniae* com teste fenotípico positivo para ESBL, foi confirmada pela técnica de PCR. Todas as amostras apresentaram positividade para uma ou mais enzimas codificadoras de ESBL (Figura 12).

Figura 11 – Frequência de enzimas do tipo ESBL em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de culturas de vigilância em neonatos, no período de agosto de 2018 a agosto de 2019



A PCR foi realizada em 38/84 (45,2%) isolados de *K. pneumoniae* para detectar as enzimas mais comuns ESBL (bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M1} , $bla_{CTX-M15}$, bla_{CTX-M8} , bla_{CTX-M9} , bla_{CTX-M2} , $bla_{CTX-M25}$).

A enzima bla_{CTX-M1} foi predominante (95%) em *K. pneumoniae* seguido por bla_{TEM} (68%) e finalmente bla_{SHV} (63%). Apenas 3 (7,8%) isolados carregavam cinco enzimas β -lactamase (bla_{SHV} , bla_{TEM} , bla_{CTX-M1} , bla_{CTX-M8} e bla_{CTX-M9}), 7 isolados carregavam 4 enzimas, 12 isolados 3 enzimas, 14 isolados 2 enzimas. A coexistência do bla_{CTX-M1} e bla_{SHV} foi detectada em 21 isolados (55,2%), bla_{CTX-M1} e bla_{TEM} em 24 isolados (63,1%), bla_{SHV} e bla_{TEM} em 12 isolados (31,5%), bla_{SHV} e bla_{CTX-M8} em 10 isolados (26,3%), bla_{SHV} e bla_{CTX-M9} em 12 isolados (31,5%). O transporte de um único gene, bla_{CTX-M1} e bla_{CTX-M9} foi observado em apenas dois isolados. A coexistência de todas as enzimas analisadas foi encontrada em apenas 3 isolados (Figura 13).

Na análise de similaridade clonal, a maioria das amostras apresentou similaridade maior que 85%, com a presença de 7 grupos. O clone A foi formado com 2 isolados, com três enzimas geneticamente idênticas, todos os isolados deste clone eram de 2019, apresentaram uma enzima de resistência diferente o CTX-M8. O clone principal B apresentou 9 amostras isoladas em 2019, o único isolado 613 foi de 2018.

Dessas, 7 amostras não eram geneticamente relacionadas, mas 2 pares eram geneticamente idênticos, apresentando as mesmas enzimas. No clone C, todos os isolados apresentaram enzimas ESBL, uma das amostras foi tipada com apenas uma enzima de resistência (CTX-M9). Este clone possui duas amostras geneticamente idênticas (1139 e 671) e três amostras geneticamente idênticas (51, 235, 875), foi formado com seis amostras. O clone D foi formado com 4 isolados, as amostras apresentaram as enzimas de resistência diferentes em cada isolado, porém CTX-M1 estava presente em todas elas. O grupo E apresentou as cinco amostras geneticamente idênticas para as enzimas ESBL, fato importante nesse grupo todas as cinco amostras foram coletadas no mês de outubro/2018, cujo mês evidenciamos um surto por *K. pneumoniae ESBL*. Grupo F composto por quatro isolados, apresentou 2 isolados geneticamente idênticos. O último grupo classificado G, composto por três isolados, nenhuma das amostras apresentaram as mesmas enzimas. Das 38 amostras de *Klebsiella pneumoniae ESBL* analisadas, 5 não se encaixaram em nenhum grupo quanto a similaridade de 85%, porém essas apresentaram de duas a cinco enzimas de resistência. Quando observamos as datas de colonização à diversidades entre os isolados, variando as datas, calculando a média obtivemos um resultado de 21 dias desde o nascimento até a colonização, variando entre 0 até 100 dias para a colonização dos RN (Figura 14).

Figura 12 – Número de enzimas do tipo ESBL de *Klebsiella pneumoniae* por número de isolados de Recém nascidos

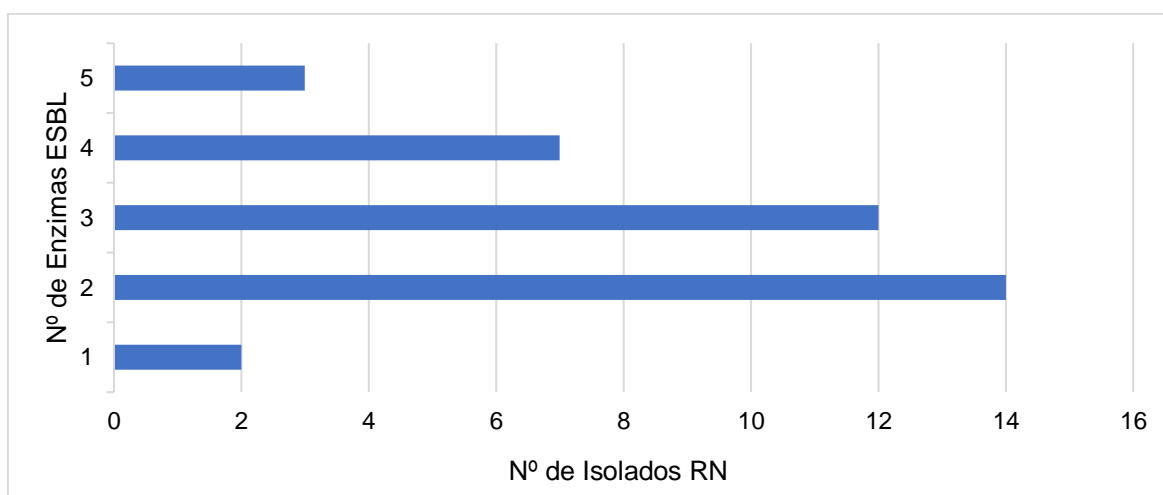
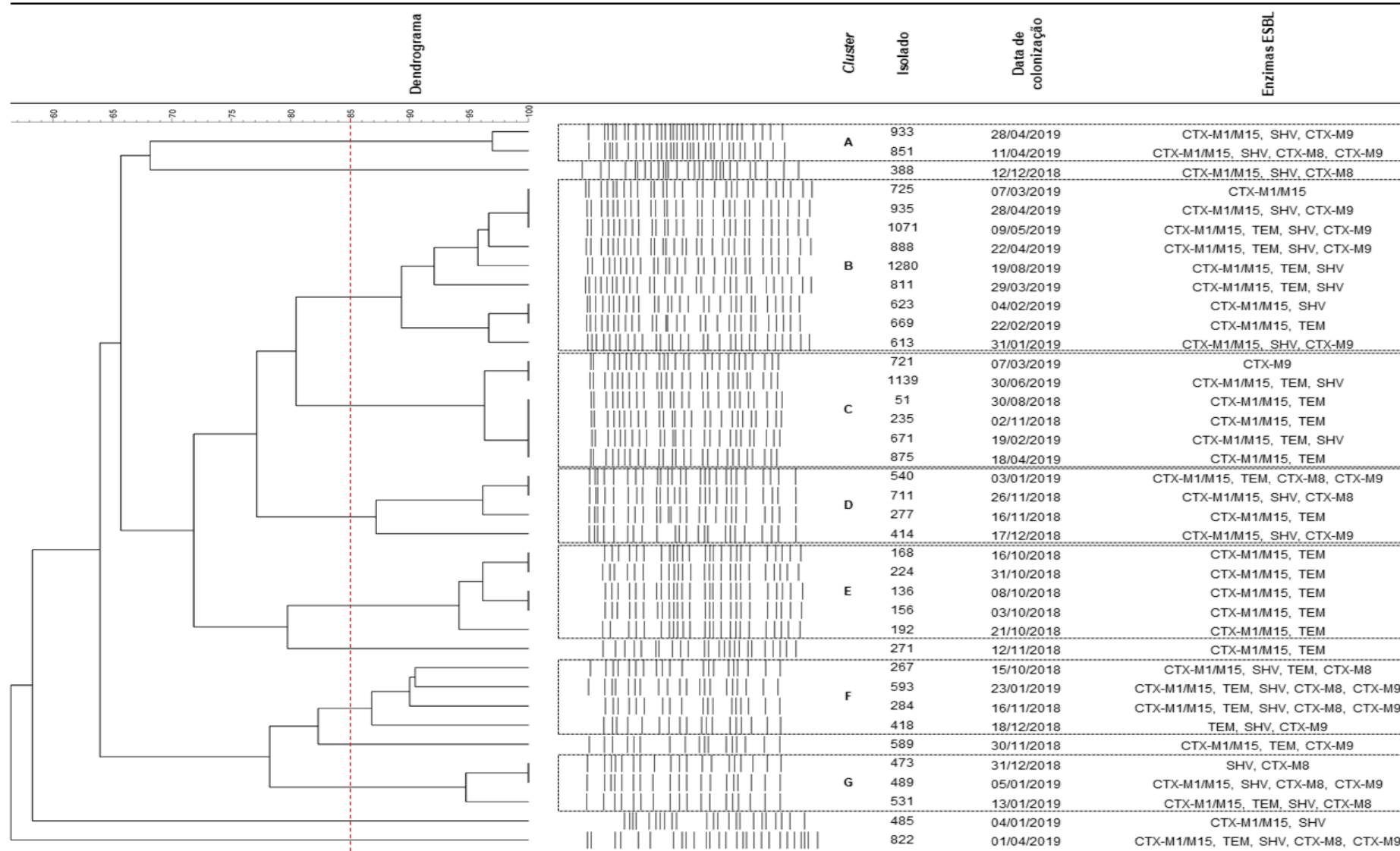


Figura 13 – Dendrograma de 38 isolados de *Klebsiella pneumoniae*, enzimas de resistência e data de colonização



Discussão

Os resultados deste estudo evidenciaram uma elevada frequência de colonização por Enterobactérias em RN internados, no período do estudo. A tendência de aumento na densidade de incidência foi impulsionada pela disseminação de Enterobactérias produtoras de ESBL, em especial por *K. pneumoniae* ESBL.

A frequência e a diversidade de espécies envolvidas diferem de acordo com a região e a ocorrência de surtos. No geral, estudos realizados na última década têm evidenciado um aumento na prevalência de bacilos Gram-negativos MR, colonizando recém-nascidos internados em UTIN ao redor do mundo (BAIER et al., 2019; LEIKINZACH et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; ROBERTS et al., 2019).

A colonização é frequente nas unidades de internação hospitalar, principalmente em unidades neonatais onde o paciente tem seu sistema imunológico imaturo, contato com vários profissionais, sua própria colonização ineficiente, vários procedimentos invasivos, uso de terapia antimicrobiana e hospitalização prolongada. Esses fatores muitas vezes favorecem episódios de infecção do neonato internado, a fonte dessa se torna importante para uma melhor conduta dentro das unidades, a própria colonização do neonato pode levar a esses episódios.

Numa revisão sistemática realizada por Folgori et al. (2018), que incluiu 6.363 neonatos, verificou-se que 1.825 (28,7%) foram colonizados por bacilos Gram-negativos. No presente estudo, a maioria dos microrganismos que colonizaram os RN eram Enterobactérias produtoras de ESBL, porém em percentuais maiores.

Em meados de janeiro de 2015, Wang et al. (2020) identificaram cinco casos de pneumonia neonatal causada por *K. pneumoniae* produtora de ESBL na UTIN, no dia 16 de fevereiro, foram observados mais quatro casos na mesma unidade da UTIN. Um surto foi declarado e medidas rigorosas de controle de infecção foram implementadas, incluindo precauções de contato, fortalecimento da higiene das mãos, limpeza do ambiente e aprimoramento da administração antimicrobiana. Os autores colaboram com nossa pesquisa, pois no ano de 2018 nos meses de outubro e novembro observamos uma alta na incidência da colonização dos RNs por *K. pneumoniae* ESBL, evidenciando um surto.

Marando et al. (2018) conduziram estudo em um hospital na Tanzânia para estabelecer preditores de sepse neonatal, de 304 neonatos, 32 foram infectados por Enterobactérias ESBL. A colonização neonatal por E-ESBL ocorreu em 166 casos.

Dos 32 neonatos infectados por E-ESBL, *K. pneumoniae* foi o patógeno mais comum (65,6%). Este também foi o caso da colonização neonatal, onde isolados de *K. pneumoniae* foram as E-ESBL mais comuns (n= 112, 67,5%). Na análise do sequenciamento do genoma a enzima ESBL para *K. pneumoniae* mais predominante foi a *bla-CTX-M15*. Semelhante ao nosso estudo, com predominância na colonização pelo mesmo patógeno e para a enzima ESBL encontrada.

Índices menores de bacilos multirresistentes têm sido identificados em países Europeus. Na Itália, Giuffrè et al. (2016a) relataram taxas de colonização por bacilos Gram-negativos de 28% entre 1.154 neonatos. Na Alemanha, numa avaliação retrospectiva conduzida por Baier et al. (2019), verificou-se que 14% de 584 recém-nascidos apresentaram algum MR da família *Enterobacteriaceae*.

Um aumento significativo na tendência de colonização por Enterobactérias produtoras de ESBL fica evidente quando analisamos a densidade de incidência. De abril a novembro de 2018, a incidência de *K. pneumoniae* variou de zero a 25,6/1.000 pacientes-dia. Vários estudos têm associado colonização com uma subsequente infecção invasiva causada pela mesma espécie bacteriana (OLIVEIRA et al., 2019; LEIKIN-ZACH et al., 2018; NORDBERG et al., 2018)

Nos Estados Unidos, um estudo observacional, retrospectivo avaliou a incidência de Enterobactérias ESBL positivo de 1999 a 2018. De 171 pacientes analisados, 150 foram colonizados por bacilos Gram-negativos e a densidade de incidência foi, em média, 1,4/1.000 pacientes dia. Assim como no nosso estudo, *K. pneumoniae* foi o agente mais frequente, no entanto, a densidade de incidência foi sete vezes menor do que a nossa (SONG et al., 2018). Provavelmente essas diferenças se devem ao período de estudo. A disseminação de Enterobactérias produtoras de ESBL se intensificou nos últimos anos.

A frequência de MR é influenciada por diversas variáveis, como período de estudo, fatores de risco dos pacientes e epidemiologia local o que torna complexa uma comparação entre diferentes pesquisas. No entanto, uma tendência é evidente na maioria dos estudos, o aumento na frequência de colonização e infecção por bacilos Gram-negativos multirresistentes, geralmente pela produção de β -lactamases.

Métodos moleculares têm sido usados para estabelecer a relação de isolados em diferentes situações para confirmar a transmissão de patógenos de uma fonte para outra, como paciente para paciente, das mãos de profissionais de saúde ou do ambiente. Métodos moleculares fornecem evidências convincentes de transmissão de

patógenos (BULABULA; DRAMOWSKI; MEHTAR, 2020). Os autores colaboram com nossa pesquisa, pois através da realização da PCR em isolados de *K. pneumoniae*, observamos uma similaridade clonal de 85%.

No Irã, estudo realizado avaliou a resistência antimicrobiana e a epidemiologia molecular de *K. pneumoniae* ESBL, um total de 30 isolados de *K. pneumoniae* foram usados para análise epidemiológica. A frequência dos genes bla_{SHV} , bla_{CTX-M} e bla_{TEM} entre esses isolados foi de 83% (n = 25), 70% (n = 21) e 57% (n = 17), respectivamente. Surpreendentemente, 11 isolados (37%) carregavam os genes bla_{SHV} , bla_{CTX-M} e bla_{TEM} simultaneamente. Além disso, a presença simultânea de “ bla_{SHV} e bla_{CTX-M} ” e “ bla_{SHV} e bla_{TEM} ” foi observada em 8 (27%) e 4 (13%) isolados, respectivamente. As análises de RAPD-PCR revelaram que os isolados de *K. pneumoniae* pertenciam a 2 tipos, entre os quais um agrupamento contava com 28 isolados (SHIMA, et al., 2019). No presente estudo a presença de mais de uma enzima ESBL, ocorreu em vários isolados.

Enzimas ESBL como TEM, SHV e CTX-M são as principais β -lactamases, especialmente CTX-M, com uma prevalência de emergência atingindo taxas acima de 85% em algumas regiões do mundo. O grupo CTX-M1 é um dos grupos CTX-M mais prevalentes na Europa e América do Norte, espalhando-se pelo mundo. Embora a prevalência desse grupo tenha aumentado nos últimos anos na América Latina, o grupo CTXM-2 continua sendo o principal grupo enzimático relatado na região. No Chile, sabe-se relativamente pouco sobre a disseminação dessas enzimas nos serviços de saúde, especialmente em unidades de pacientes críticos, por não existir programas de vigilância em todo o país para esse mecanismo de resistência bacteriana. (PAVEZ et al., 2019)

O quadro global das variantes do CTX-M é complexo, mas está claro que o $bla_{CTXM-15}$ aumentou ao longo do tempo na maioria dos países e é dominante na maioria das regiões. As exceções são China, Sudeste Asiático, Coreia do Sul, Japão e Espanha, onde $bla_{CTX-M14}$ é dominante, e América do Sul, onde bla_{CTX-M2} ainda é significativo (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017).

Garcia-fulgueiras et al. (2017) avaliaram relatórios internacionais sobre infecções por Enterobactérias em crianças, e $bla_{CTX-M15}$ foi a enzima ESBL mais frequentemente detectado. No entanto, a distribuição de outras ESBLs parece obedecer a realidades epidemiológicas mais regionais. Assim, nos EUA ou na França, $bla_{CTX-M14}$ é relatado como o segundo em prevalência, bla_{SHV12} no México. No Uruguai,

até o ano de pesquisa, o bla_{CTX-M2} parece ser a segunda ESBL mais frequente encontrada em Enterobactérias recuperadas de adultos e crianças. Concordando com nosso estudo para bla_{CTX-M15}, que apresentou maior prevalência, diferente do bla_{CTX-M2}, que não foram encontrados nenhum isolado em nossas amostras, porém nossos isolados eram todos de recém nascidos.

Em estudo realizado por Corbella et al. (2018), descreveram um surto por *K. pneumoniae* ESBL, ocorrido durante o período de janeiro a setembro de 2013 na UCIN de um hospital no norte da Itália, que afetou 92 bebês, 26 infectados e 66 colonizados. Um total de 97 isolados de *K. pneumoniae* foram identificadas durante o período do surto, 16 delas, junto com 3 que haviam sido isoladas anteriormente, foram submetidas a caracterização molecular. Um padrão clonal foi observado entre 18/19 isolados, não apenas os 16 isolados do surto, mas também dois coletados em 2012 acabaram pertencendo a um único clone. Este resultado indica claramente que o isolado do surto estava presente na unidade de internação por pelo menos 6 meses antes do início do surto. Estes 18 isolados pertencentes ao mesmo clone carregavam a enzima bla_{CTX-M-15}.

Este estudo fornece conhecimento sobre a Colonização por Enterobactérias em Unidades de Terapia e Cuidado Intensivo Neonatal. Evidenciando clones dentro da unidade, o que sugere fontes comuns de transmissão. Podendo assim aumentar a conscientização sobre a resistência aos antimicrobianos transmitidos nessas unidades, e melhorias quanto aos cuidados, evitando a disseminação.

A prevalência de Enterobactérias produtoras de ESBL neste estudo foi de 95% nas unidades neonatal, com maior frequência para *Klebsiella pneumoniae*, todos os isolados avaliados Genotipicamente apresentaram de dois a cinco genes de resistência para ESBL, do tipo CTX-M, TEM e SHV. *Klebsiella pneumoniae* é um microrganismo que possui um importante fator de transferência de resistência para outras Enterobactérias, e permanece por um longo período em unidades, o que reforça a necessidade de culturas de vigilância epidemiológica para detecção dessas bactérias, pois devem fazer parte da rotina dos hospitais e medida de prevenção e controle da disseminação desses microrganismos multirresistentes devem ser tomadas, principalmente nos setores neonatais, pois trata-se de pacientes críticos e imunocomprometidos.

Referências

- AGARWAL, R. et al. Characterisation and antimicrobial resistance of sepsis pathogens in neonates born in tertiary care centres in Delhi, India: a cohort study. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 10, p. e752–e760, 2016.
- BAIER, C. et al. Prospective surveillance of bacterial colonization and primary sepsis: findings of a tertiary neonatal intensive and intermediate care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 102, n. 3, p. 325–331, 2019.
- BEDENIĆ, B. et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Zagreb, Croatia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 505–508, 2001.
- BENGOECHEA, J. A.; SA PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, p. 123–144, 2019.
- BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2145–2155, 2017.
- BONNET, R. et al. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936–1942, 2000.
- BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1–22, 2020.
- BULABULA, A. N. H.; DRAMOWSKI, A.; MEHTAR, S. Transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria from colonized mothers to their infants: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 104, n. 1, p. 57–67, 2020.
- CLOCK, S. A. et al. Colonization with antimicrobial-resistant Gram-negative bacilli at neonatal intensive care unit discharge. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. 219–226, 2017.
- CLSI et al. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S10. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. September, p. 18, 2017.
- CORBELLA, M. et al. Characterization of an outbreak of extended-spectrum β -Lactamase-producing *klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in Italy. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 8, p. 1128–1136, 2018.
- DE OLIVEIRA, P. M. N. et al. Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–7, 2019.

- DESTA, K. et al. High gastrointestinal colonization rate with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospitalized patients: Emergence of carbapenemase-producing *K. Pneumoniae* in Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–14, 2016.
- FOLGORI, L. et al. The relationship between Gram-negative colonization and bloodstream infections in neonates: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 251–257, 2018.
- FOLGORI, L.; BIELICKI, J. Future Challenges in Pediatric and Neonatal Sepsis: Emerging Pathogens and Antimicrobial Resistance. **Journal of Pediatric Intensive Care**, v. 08, n. 01, p. 017–024, mar. 2019.
- FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416–422, 2016.
- GARCIA-FULGUEIRAS, V. et al. Allodemic distribution of plasmids co-harboring bla CTX-M-15 /aac(6')-Ib-cr/qnrB in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum β -lactamases in Uruguay's paediatric hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, p. 68–73, 2017.
- GARCÍA, C. et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producer *klebsiella pneumoniae* isolates causing neonatal sepsis in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 285–288, 2016.
- GIUFFRÈ, M. et al. The Increasing Challenge of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. **Medicine**, v. 95, n. 10, p. e3016, mar. 2016.
- HAASE, R. et al. Colonization and Infection due to Multi-resistant Bacteria in Neonates: A Single Center Analysis. **Klinische Pädiatrie**, v. 226, n. 01, p. 8–12, out. 2014.
- HENNEQUIN, C.; ROBIN, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 333–341, 2016.
- JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 11. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2015.
- LEIKIN-ZACH, V. et al. Neonatal Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in the Neonatal Intensive Care Unit. **The Israel Medical Association journal : IMAJ**, v. 20, n. 5, p. 286–290, 2018.
- LONA-REYES, J. C. et al. Prevalencia de β -lactamasas de espectro extendido en enterobacterias causantes de sepsis neonatal y factores asociados. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 4, p. 433–441, 2019.
- MARANDO, R. et al. Predictors of the extended-spectrum-beta lactamases producing Enterobacteriaceae neonatal sepsis at a tertiary hospital, Tanzania. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 7, p. 803–811, 2018.
- MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory

genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–15, 2018.

MOSHIRI, T.; MAHIDA, N.; SOO, S. **Multi-resistant Gram negative Enterobacteriaceae in paediatrics: an infection prevention and control challenge** *Paediatrics and Child Health (United Kingdom)* Elsevier Ltd, , 2018.

NAAS, T. 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**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

NORDBERG, V. et al. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a 5-year follow-up study. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 10–15, 2018a.

NORDBERG, V. et al. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a 5-year follow-up study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 9, p. 1004–1009, 2018b.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, n. May, p. 1–84, 2016.

OLIVEIRA, D. M. P. DE et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 1–49, 2020.

PAVEZ, M. et al. High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing enterobacteriaceae infection in intensive care units in southern Chile. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 102–110, 2019.

ROBERTS, T. et al. Antimicrobial-resistant Gram-negative colonization in infants from a neonatal intensive care unit in Thailand. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 2, p. 151–155, out. 2019.

SAKAI, A. M. et al. Colonization profile and duration by multi-resistant organisms in a prospective cohort of newborns after hospital discharge. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, n. 15, p. 1384–1389, 2020.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. New York: Cold Spring Harb Lab Press, 2001.

SANCHES, B. et al. The age of multidrug resistance: Ten year incidence in a neonatal intensive care unit. **Acta Medica Portuguesa**, v. 33, n. 3, p. 183–190, 2020.

SHIMA MAHMOUDI, BABAK POURAKBARI, ALIAKBAR RAHBARIMANESH, MOHAMMAD REZA ABDOSALEHI, K. G. E S. M. *. “An Outbreak of ESBL-production *Klebsiella pneumoniae* in an Iranian Referral Hospital: Epidemiology and Molecular Typing”,. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 19, n. 1, p. 9, 2019.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. 1. ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

SONG, X. et al. Reassessing the need for active surveillance of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the neonatal intensive care population. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 12, p. 1436–1441, 2018.

VERSALOVIC, J. et al. Institute for Molecular Genetics and department of Pediatrics , Baylor College of Medicine ,. **Cell**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

WANG, Y. et al. Genomic epidemiology of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* st471 producing extended-spectrum β -lactamases in a neonatal intensive care unit. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1081–1090, 2020.

WHO. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report**. Geneva, World Health Organization. [s.l: s.n.].

ZAIDI, A. K. M. et al. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. **Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1175–1188, 2005.

5 CONCLUSÃO

Durante 20 anos de estudo, foi identificado uma alta frequência de microrganismos do grupo ESKAPE, na colonização de neonatos hospitalizados. Os microrganismos mais frequentes encontrados foram os bacilos Gram-negativos, com destaque para Enterobactérias produtoras de ESBL, e bacilos Gram-negativos não fermentadores CR, e CRE. Entre os cocos Gram-positivos os mais frequentes foram MRSA seguidos por VRE.

Durante os anos ocorreu uma tendência de aumento na densidade de incidência de bacilos Gram-negativos, com algumas flutuações em períodos de surtos, enquanto os cocos Gram-positivos apresentaram um pico entre 2006 e 2007 e uma redução significativa a partir de então. Observamos que bacilos Gram-negativos produtores de ESBL foram mais frequentes do que os resistentes a carbapenêmicos. Entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores resistentes a carbapenêmicos, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, foram identificados a partir de 2005, sendo *A. baumannii* o mais frequente. Em nosso grupo as Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos foram identificadas pela primeira vez em 2012, tendo ocorrido um surto entre 2014 e 2015, e diminuindo significativamente até 2019. Em 2006 e 2007 ocorreu um surto por VRE. MRSA foi identificado em todo período de estudo tendo alcançado os maiores valores de incidência em 2006, 2007, 2012 e 2018. Nos anos de 2018 e 2019 a frequência de Enterobactérias foi maior do que a de bacilos Gram-negativos não fermentadores, superando a densidade de incidência e o limite de controle nos meses de outubro e novembro de 2018, a custos de *K. pneumoniae*, caracterizando assim um surto. Nesse mesmo ano os bacilos Gram-negativos mais frequentes foram *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *E. cloacae*.

A maioria dos isolados de *K. pneumoniae*, quando analisadas geneticamente foram produtoras de ESBL e albergavam mais de um gene, variando de dois a cinco. Dentre esses os mais frequentes foram *bla*_{CTX-M1/15}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}.

Pela alta frequência de microrganismos resistentes em nosso estudo, podemos concluir que, estratégias de prevenção, como o uso racional de agentes antimicrobianos, implementação de vigilância para MR, são necessárias para prevenir e controlar a disseminação de patógenos resistentes. Outros estudos em vigilância epidemiológica para as UTIN, são necessários, para colaborarem com a prevenção.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. et al. Characterisation and antimicrobial resistance of sepsis pathogens in neonates born in tertiary care centres in Delhi, India: a cohort study. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 10, p. e752–e760, 2016.
- AIRES-DE-SOUSA, M. et al. Intestinal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at admission in a Portuguese hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 4, p. 783–790, abr. 2020.
- AKINBOYO, I. C. et al. Epidemiology and risk factors for recurrent Staphylococcus aureus colonization following active surveillance and decolonization in the NICU. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 11, p. 1334–1339, nov. 2018.
- ALIZADEH, NASER, REZAEI, MOHAMMAD AHANGARZADEH, KAFIL, HOSSEIN SAMADI, HASANI, A. E. AL. Evaluation of Resistance Mechanisms in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1377–1385, 2020.
- ANDERSSON, P. et al. Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) outbreak in a neonatal intensive care unit and special care nursery at a tertiary-care hospital in Australia - A retrospective case-control study. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 40, n. 5, p. 551–558, 14 maio 2019.
- ANVISA. Critérios Diagnósticos de Infecção Associada à Assistência à Saúde Neonatologia. **Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**, v. 1, 2017.
- BAIER, C. et al. Prospective surveillance of bacterial colonization and primary sepsis: findings of a tertiary neonatal intensive and intermediate care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 102, n. 3, p. 325–331, 2019.
- BAIG, S. et al. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, n. January, p. 74–76, 2018.
- BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 22, 2013.
- BASSETTI, M. et al. How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. **Drugs in Context**, v. 7, p. 1–18, 2018.
- BEDENIĆ, B. et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases from Klebsiella pneumoniae strains isolated in Zagreb, Croatia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 505–508, 2001.
- BENGOECHEA, J. A.; SA PESSOA, J. Klebsiella pneumoniae infection biology: Living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, p. 123–144, 2019.

BEREZIN, E. N.; SOLÓRZANO, F. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 942–953, 2014.

BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2145–2155, 2017.

BEYENE, D. et al. Multidrug-resistant profile and prevalence of extended spectrum β -lactamase and carbapenemase production in fermentative Gram-negative bacilli recovered from patients and specimens referred to National Reference Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–13, 2019.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, jan. 2015.

BONNET, R. et al. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936–1942, 2000.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1–22, 2020.

BRINK, A. J.; RICHARDS, G. A. The role of multidrug and extensive-drug resistant Gram-negative bacteria in skin and soft tissue infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, p. 1, jan. 2020.

BULABULA, A. N. H.; DRAMOWSKI, A.; MEHTAR, S. Transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria from colonized mothers to their infants: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 104, n. 1, p. 57–67, 2020.

BUSH, K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549–559, 2013.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 295–306, maio 2019.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 1–37, 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CAMERON, D. R. et al. Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitors. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 10, p. 767–773, 2017.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. **Centers for Disease Control and Prevention**, v. 1, p. 1–113, 2019.

CHAMON, R. C. et al. Genome Sequence of a Highly Virulent pvl-positive Vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 30. **Current Genomics**, v. 21, n. 2, p. 128–137, maio 2020.

CLOCK, S. A. et al. Colonization with antimicrobial-resistant Gram-negative bacilli at neonatal intensive care unit discharge. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. 219–226, 2017a.

CLOCK, S. A. et al. Infant colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant enterococci preceding neonatal intensive care unit discharge. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. e144–e148, 2017b.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M02-A12**. 35. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100**. 27. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

CLSI et al. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S10. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. September, p. 18, 2019.

CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169–176, jan. 2020.

CORBELLA, M. et al. Characterization of an outbreak of extended-spectrum β -Lactamase-producing *klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in Italy. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 8, p. 1128–1136, 2018.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J.-P.; PAGÈS, J.-M. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 1–32, jul. 2019.

DE BRITO, C. S. et al. The nares as a CA-MRSA reservoir in the healthy elderly. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 614–616, 2015.

DE OLIVEIRA, P. M. N. et al. Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–7, 2019.

DESTA, K. et al. High gastrointestinal colonization rate with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in hospitalized patients: Emergence of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–14, 2016.

DHANJI, H. et al. Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant ST131 *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in nursing homes in Belfast, UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. 297–303, 2011.

DIAS, M.; SALEEM, J. Surface colonization and subsequent development of infections with multi drug resistant organisms in a neonatal intensive care unit. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2019.

DUARTE, F. C. et al. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 3, p. 232–238, jul. 2018.

ECDC. **Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018**. Stockholm: [s.n.].

FOLGORI, L. et al. The relationship between Gram-negative colonization and bloodstream infections in neonates: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 251–257, 2018.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416–422, 2016.

GARCIA-FULGUEIRAS, V. et al. Allodemic distribution of plasmids co-harboring bla CTX-M-15 /aac(6')-Ib-cr/qnrB in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum β -lactamases in Uruguay's paediatric hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, p. 68–73, 2017.

GARCÍA, C. et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producer *klebsiella pneumoniae* isolates causing neonatal sepsis in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 285–288, 2016.

GHADDAR, N. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Produced by *Escherichia coli* Colonizing Pregnant Women. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2020, p. 1–7, jan. 2020.

GIUFFRÈ, M. et al. The Increasing Challenge of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. **Medicine**, v. 95, n. 10, p. e3016, mar. 2016.

GOLAN, Y. et al. Transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus* in a neonatal intensive care unit. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, n. 6, p. 566–567, jun. 2005.

HAASE, R. et al. Colonization and Infection due to Multi-resistant Bacteria in Neonates: A Single Center Analysis. **Klinische Pädiatrie**, v. 226, n. 01, p. 8–12, out. 2014.

HAENNI, M. et al. Resistance of animal strains of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenems. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–10, 2017.

HARBARTH, S. et al. Global priority list of antibiotic-resistant list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organisation**, 2019.

HENNEQUIN, C.; ROBIN, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 333–341, 2016.

HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135–136, jul. 1997.

HOWDEN, B. P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010.

HUANG, S. et al. Prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA among methicillin-resistant *S. aureus* with high vancomycin minimal inhibitory concentrations in Taiwan: A multicenter surveillance study, 2012–2013. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 5, p. 701–707, out. 2016.

JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 11. ed. Washington, DC, USA: ASM Press, 2015.

KARLOWSKY, J. A. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia–Pacific countries: SMART 2013–2015. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 61–69, jan. 2017.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–103, set. 2018.

LANDRY, E. et al. Urinary tract infections: Leading initiatives in selecting empiric outpatient treatment (UTILISE). **Canadian Journal of Hospital Pharmacy**, v. 67, n. 2, p. 116–125, 2014.

LEIKIN-ZACH, V. et al. Neonatal Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in the Neonatal Intensive Care Unit. **The Israel Medical Association journal : IMAJ**, v. 20, n. 5, p. 286–290, 2018.

LIN, J. et al. A prospective cohort study of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in neonates: The role of maternal carriage and phenotypic and molecular characteristics. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 555–565, 2018.

LONA-REYES, J. C. et al. **Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria of neonatal sepsis and associated factors** *Revista Chilena de Infectología*, 2019a.

LONA-REYES, J. C. et al. Prevalencia de β-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias causantes de sepsis neonatal y factores asociados. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 4, p. 433–441, 2019b.

LYLES, R. D. et al. Regional Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Among Critically Ill Children in a State With Mandated Active Surveillance. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 5, n. 4, p. 409–416, dez. 2016.

MARANDO, R. et al. Predictors of the extended-spectrum-beta lactamases producing Enterobacteriaceae neonatal sepsis at a tertiary hospital, Tanzania. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 7, p. 803–811, 2018.

MAROM, R. et al. A silent outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a neonatal intensive care unit. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 87, dez. 2020.

MARRA, A. R. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, maio 2011.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–15, 2018.

MOSHIRI, T.; MAHIDA, N.; SOO, S. **Multi-resistant Gram negative Enterobacteriaceae in paediatrics: an infection prevention and control challenge** *Paediatrics and Child Health (United Kingdom)* Elsevier Ltd, , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.paed.2018.03.002>>

MULEY, V. A.; GHADAGE, D. P.; BHORE, A. V. Bacteriological profile of neonatal septicemia in a tertiary care hospital from Western India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 75–77, 2015.

MUNITA, J. M.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Evolving Resistance Among Gram-positive Pathogens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl 2, p. S48–S57, set. 2015.

MUSSI-PINHATA, M. M.; DO NASCIMENTO, S. D. Infecções neonatais hospitalares. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. SUPPL. 1, p. 81–96, 2001.

NAAS, T. 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**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

NAVEED, M. et al. Antibiotics resistance mechanism. **Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment: Volume 1 in the Advances in Environmental Pollution Research Series**, n. May 2017, p. 292–312, 2019.

NEEMANN, K. et al. Neonatal outcomes associated with maternal recto-vaginal colonization with extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in Nigeria: a prospective, cross-sectional study. **Clinical Microbiology and Infection**, n. xxxx, 2019.

NORDBERG, V. et al. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a 5-year follow-up study. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 10–15, 2018a.

NORDBERG, V. et al. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a 5-year follow-up study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 9, p. 1004–1009, 2018b.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, n. May, p. 1–84, 2016.

OLIVEIRA, D. M. P. DE et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 1–49, 2020.

PARM, U. et al. Risk factors associated with gut and nasopharyngeal colonization by common Gram-negative species and yeasts in neonatal intensive care units patients. **Early Human Development**, v. 87, n. 6, p. 391–399, 2011.

PARTE, A. C. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 0–5, 2020.

PAUL-LOUIS WOERTHER, CHARLES BURDET, E. C. AND A. A. **Extended-Spectrum β -Lactamases-2013.pdf**, 2013.

PAVEZ, M. et al. High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing enterobacteriaceae infection in intensive care units in southern Chile. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 102–110, 2019.

PERUGINI, M. R. E. et al. Impact of the reduction of environmental and equipment contamination on vancomycin-resistant enterococcus rates. **Infection**, v. 39, n. 6, p. 587–593, 2011.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RAZA, T. et al. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. **J Pak Med Assoc**, v. 68, n. 5, p. 768–772, 2018.

RETTEDAL, S. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in Norway: Prevalence and maternal-neonatal transmission. **Journal of Perinatology**, v. 35, n. 11, p. 907–912, 2015.

RINCÓN, S. et al. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. **Biomédica**, v. 34, p. 191, fev. 2014.

ROBERTS, T. et al. Antimicrobial-resistant Gram-negative colonization in infants from a neonatal intensive care unit in Thailand. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 2, p. 151–155, out. 2019.

RODRÍGUEZ, C. H.; NASTRO, M.; FAMIGLIETTI, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 3, p. 327–333, 2018.

SAHOO, R. K. et al. Genotypic validation of extended-spectrum β -lactamase and virulence factors in multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* in an Indian hospital. **Pathogens and Global Health**, v. 00, n. 00, p. 1–7, 2019.

SAKAI, A. M. et al. Colonization by multidrug-resistant microorganisms of hospitalized newborns and their mothers in the neonatal unit context. **Journal of infection in developing countries**, v. 14, n. 7, p. 765–771, 2020a.

SAKAI, A. M. et al. Colonization profile and duration by multi-resistant organisms in a prospective cohort of newborns after hospital discharge. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, n. 15, p. 1384–1389, 2020b.

SALEEM, A. F. et al. The Gut of Healthy Infants in the Community as a Reservoir of ESBL and Carbapenemase-Producing Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 286, maio 2020.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. New York: Cold Spring Harb Lab Press, 2001.

SANCHES, B. et al. The age of multidrug resistance: Ten year incidence in a neonatal intensive care unit. **Acta Medica Portuguesa**, v. 33, n. 3, p. 183–190, 2020.

SAWA, T.; KOOGUCHI, K.; MORIYAMA, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. **Journal of Intensive Care**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2020.

SHIMA MAHMOUDI, BABAK POURAKBARI, ALIAKBAR RAHBARIMANESH, MOHAMMAD REZA ABDOSALEHI, K. G. E S. M. *. “An Outbreak of ESBL-production *Klebsiella pneumoniae* in an Iranian Referral Hospital: Epidemiology and Molecular Typing”. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 19, n. 1, p. 9, 2019.

SHIRAI, Y. et al. Neonatal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection. **Journal of Neonatal-Perinatal Medicine**, v. 10, n. 4, p. 439–444, 2017.

SHORE, A. C. et al. First Report of cfr -Carrying Plasmids in the Pandemic Sequence Type 22 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type IV Clone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3007–3015, maio 2016.

SILVA, D. M. DA. **Perfil de susceptibilidade e prevalência de bactérias do grupo ESKAPE em um hospital público do Distrito Federal**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE CEILÂNDIA, 2016.

SILVA, K. C. DA; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

SIMON, A.; TENENBAUM, T. Surveillance of Multidrug-resistant Gram-negative Pathogens in High-risk Neonates—Does it Make a Difference? **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 4, p. 407–409, abr. 2013.

SINGH, H.; THANGARAJ, P.; CHAKRABARTI, A. Acinetobacter baumannii: A brief account of mechanisms of multidrug resistance and current and future therapeutic management. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 11, p. 2602–2605, 2013.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. 1. ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

SONG, X. et al. Reassessing the need for active surveillance of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the neonatal intensive care population. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 12, p. 1436–1441, 2018.

SORSA, A. et al. Blood culture result profile and antimicrobial resistance pattern: A report from neonatal intensive care unit (NICU), Asella teaching and referral hospital, Asella, south East Ethiopia. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 6–11, 2019.

STAPLETON, P. J. M. et al. Outbreaks of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in neonatal intensive care units: A systematic review. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, v. 101, n. 1, p. F72–F78, 2016.

SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA. Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 122, ago. 2019.

THAPA, S.; SAPKOTA, L. B. Changing Trend of Neonatal Septicemia and Antibiotic Susceptibility Pattern of Isolates in Nepal. **International Journal of Pediatrics**, v. 2019, p. 1–7, 2019.

UC-CACHÓN, A. H. et al. High prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolated bacilli in intensive care units at a tertiary-care hospital in Yucatán Mexico. **Medicina (Lithuania)**, v. 55, n. 9, 2019.

VAN HARTEN, R. M. et al. Multidrug-Resistant Enterococcal Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies? **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 467–479, jun. 2017.

VERSALOVIC, J. et al. Institute for Molecular Genetics and department of Pediatrics, Baylor College of Medicine. **Cell**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

VERSPORTEN, A. et al. Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 381–387, maio 2014.

WANG, Y. et al. Genomic epidemiology of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* st471 producing extended-spectrum β -lactamases in a neonatal intensive care unit. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1081–1090, 2020.

WEINER-LASTINGER, L. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with pediatric healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 19–30, jan. 2020.

WEINER, L. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288–1301, nov. 2016.

WHO. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. Geneva, World Health Organization.** [s.l: s.n.].

WILCOX, M. et al. Reporting elevated vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: consensus by an International Working Group. **Future Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 345–352, mar. 2019.

XERCAVINS, M. et al. High clonal diversity of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples in a non-outbreak situation . A cohort study. v. 9, p. 1–9, 2020.

YAYAN, J.; GHEBREMEDHIN, B.; RASCHE, K. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-Year Period. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–20, 2015.

YUSEF, D. et al. Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit in the era of multi-drug resistant organisms: A retrospective review. **Pediatrics and Neonatology**, v. 59, n. 1, p. 35–41, 2018.

ZAHEER, R. et al. Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020.

ZAIDI, A. K. M. et al. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. **Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1175–1188, 2005.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 361–385, 2008.

ZARRILLI, R. et al. *Acinetobacter* Infections in Neonates. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 12, p. 20–24, 2018.

ZHANG, F. et al. Further Spread of bla_{NDM-5} in *Enterobacteriaceae* via IncX3 Plasmids in Shanghai, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. March, p. 3–7, mar. 2016.