



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SILVIA CLAY GOMES MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DE COLONIZAÇÃO POR BACIOS GRAM  
NEGATIVOS MULTIRRESISTENTES E DESENVOLVIMENTO  
DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE  
EM CRIANÇAS HOSPITALIZADAS.**

SILVIA CLAY GOMES MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DE COLONIZAÇÃO POR BACIOS GRAM  
NEGATIVOS MULTIRRESISTENTES E DESENVOLVIMENTO  
DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE  
EM CRIANÇAS HOSPITALIZADAS.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Dário Capobiango.

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini.

Londrina  
2019

SILVIA CLAY GOMES MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DE COLONIZAÇÃO POR BACIOS GRAM NEGATIVOS  
MULTIRRESISTENTES E DESENVOLVIMENTO DE INFECÇÃO  
RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE EM CRIANÇAS  
HOSPITALIZADAS.**

Dissertação de Mestrado 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. Jaqueline Dario Capobiango  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Eliana Carolina Vespero  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Gilselena Kerbauy Lopes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de março de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, único e capaz de nossa criação e sabedoria.

À minha mãe Vera Lúcia e Vó Maria Benedita pela educação e amor recebidos.

A meu esposo Pedro e filhos (Rafael e Maria Júlia) pela paciência e amor.

À minha orientadora Professora Dra. Jaqueline Dario Capobiango pela confiança, calma, paciência e dedicação neste tempo de curso.

À professora Dra. Márcia Regina Eches Perugini, pela co-orientação e o grande carinho que demonstrou comigo.

A todos os docentes do programa, em especial à professora Eliana Carolina Vespero pelo apoio no laboratório de Biologia Molecular;

Aos colegas do Laboratório de Pós Graduação, em especial à Ana Paula Daga e minha irmã Gerusa Luciana Gomes Magalhães pela ajuda na realização das técnicas laboratoriais;

À colega Ana Paula Kallaur pelo incentivo e ajuda neste trabalho.

À minha grande companheira de trabalho Adriana Gomes da Silva Colluço por ter me substituído nas atividades em minha ausência.

Às professoras Gilselena Kerbauy Lopes e Mauren T. Grubisich Mendes Tacla do Departamento de Enfermagem, pela valiosa colaboração no projeto de pesquisa.

À enfermeira Louise Marina Silva Fontana, pelo auxílio na coleta de dados.

Aos pacientes e suas mães que, voluntariamente, participaram do projeto de pesquisa que norteou este estudo.

Magalhães, Silvia Clay Gomes. **Avaliação de colonização por bacilos gram negativos multirresistentes e desenvolvimento de infecção relacionada à assistência à saúde em crianças hospitalizadas.** 2019. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A crescente colonização de pele e mucosas de pacientes hospitalizados por microrganismos multirresistentes (MR) merece atenção nos serviços de saúde. Os MR como agentes de infecção são um desafio para o tratamento, tornando essa situação um problema de saúde pública. Este trabalho teve como objetivo avaliar a colonização por bacilos Gram negativos multirresistentes (BGN MR) e determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e genes de resistência em uma população pediátrica. Foi realizado um estudo caso-controle e definido como paciente colonizado por BGN MR, quando o mesmo apresentava o primeiro *swab* negativo e após pelo menos um *swab* ou material estéril positivo para BGN MR, na mesma internação. Os pacientes com dois *swabs* ou mais negativos e material estéril sem isolamento de BGN MR na mesma internação, foram considerados não colonizados por BGN MR. As variáveis comparadas entre os grupos foram: infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS), cateter venoso central (CVC), ventilação pulmonar mecânica (VPM), cateter vesical de demora (CVD) e desfecho (alta ou óbito). A sensibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos foi analisada pela técnica de disco-difusão e a análise da diversidade genética dos isolados foi realizada por ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR). A análise estatística foi realizada com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20 para Windows. As variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, e as variáveis contínuas foram analisadas pelo Teste de Mann Whitney. Entre 687 pacientes entre 0 a 12 anos de idade internados de Janeiro a Dezembro de 2016, na Enfermaria de Pediatria e UTI Pediátrica do HU de Londrina, 432 crianças não colheram culturas, 255 crianças colheram cultura, destas, 106 foram caracterizadas como grupo controle. 149 crianças tiveram culturas positivas, destas, 114 foram excluídas, pois não foi possível definir o momento da colonização e 35 crianças foram caracterizadas como grupo caso. Os pacientes com infecção apresentaram 4 vezes mais chance de colonização por BGN MR em comparação aos não infectados. O tempo para positividade do *swab* foi de 3 a 51 dias, com mediana de 9 dias. As crianças do sexo masculino colonizadas por BGN MR tiveram 16% menos chance de apresentar infecção que as do sexo feminino. Entre as crianças colonizadas por BGN MR a presença de um procedimento invasivo, aumentou em 15 vezes a chance de apresentar infecção. Para as crianças não colonizadas por BGN MR, a presença de um procedimento invasivo aumentou em 4 vezes a chance de apresentar infecção. Entre as 20 cepas de BGN MR analisadas, menor resistência foi encontrada para ertapenem e amicacina, com 100% de sensibilidade ao meropenem e imipenem. O mecanismo de resistência mais encontrado foi a produção de enzimas CTXM1, seguido de CTXM15 e SHV. Nossos resultados demonstraram que a colonização por BGN MR foi associada a infecção em pacientes pediátricos, portanto, devem-se utilizar medidas de prevenção da colonização por MR.

**Palavras-chave:** *Enterobacteriaceae*. Resistência microbiana a medicamentos. Infecção hospitalar. Infecções relacionadas a cateter.

MAGALHÃES, Silvia Clay Gomes. **Evaluation of colonization by multidrug resistant gram-negative bacilli and increasing infection related to health assistance in hospitalized children.** 2019. 71 p. Dissertation (Masters's degree in Clinical and Laboratorial Pathophysiology). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

The increasing skin and mucosa's colonization by multi-resistant microorganisms (MR) in hospitalized patients deserves attention in the public health system. MR are a challenge regarding treatment, as they are the infectious agents, in which it becomes a public health issue. This study's objective was to evaluate colonization by MR GNB to determine the MR GNB antimicrobial susceptibility profile and resistant genes in a paediatric population. A case-control study was carried out, and a patient was considered colonized by MR GNB when his or her first swab was negative and he or she subsequently presented at least one swab or sterile material positive for MR GNB during the same hospital stay. Patients with two or more negative swabs and sterile material without MR GNB isolation at the same hospital stay were considered non-colonized by MR GNB. The variables that were compared between the groups were infection, central venous catheter, lung mechanical ventilation, long-term urinary catheter, and outcome. The sensitivity of the bacteria to the antimicrobial agents was analysed by the disc-diffusion technique, and the genetic diversity of the isolated ones was analysed by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA), version 20 for Windows; categorical variables were analysed by the chi-square test or Fisher's exact test, and continuous variables were analysed by the Mann-Whitney test. Among 687 hospitalized patients, from zero to 12 years-old, analysed from January to December of 2016, in the paediatric ward and in the paediatric ICU of Londrina University Hospital, 432 children were not submitted to collection of samples; 255 children had their samples collected, and 106 of those were characterized as a controlled group. Besides, 149 children had their samples diagnosed as positive. In such, 35 of them were considered the case-group. However, 114 patients were excluded from the research because it was not possible to define when they were colonized. The time to swab positivation was from 3 to 51 days, with an average of 9 days. Patients with infection had 4 times greater odds of being colonized by MR GNB than non-infected patients. Male children colonized by MR GNB were 16% less likely than female children to present infection. Among children colonized by MR GNB, the presence of an invasive procedure increased the odds of infection by 15 times. In children who were not colonized by MR GNB, the presence of an invasive procedure increased the odds of infection by 4 times. Among the 20 strains of MR GNB analysed, lower resistance was found for ertapenem and amikacin, with 100% sensitivity to meropenem and imipenem. The most common resistance mechanism was the production of CTXM1 enzymes, followed by CTXM15 and SHV. In conclusion, Colonization by MR GNB was associated with infection in paediatric patients; therefore, measures should be taken to prevent colonization by MR GNB.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*. Drug resistance microbial. Cross infection. Catheter-related INFECTIONS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Distribuição dos pacientes do estudo.....	24
<b>Fig. 1.</b>	Flowchart summary of the study.....	48
<b>Fig. 2.</b>	Presentation of multidrug resistant gram-negative bacilli (n = 35).....	49
<b>Fig. 3.</b>	Dendrogram, antimicrobial resistance profile and main resistance enzymes of multidrug resistant gram-negative bacilli.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b>	Analysis of the association of colonization by multidrug resistant gram- negative bacilli (MR GNB) with clinical-demographic variables.....	52
<b>Table 2.</b>	Analysis of the association of infection with the demographic and clinical data of patients colonized by multiresistant gram-negative bacilli .....	53
<b>Table 3. –</b>	Analysis of the association of infection with the demographic and clinical data of patients not colonized by multiresistant gram-negative bacilli.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGN	Bacilo Gram Negativo
ESBL	Betalactamases de Espectro Estendido
BGN MR	Bacilo Gram Negativo Multirresistente
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CDV	Cateter Vesical de Demora
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CR	Resistente aos Carbapenêmicos
CVC	Cateter Vascular Central
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i>
HU	Hospital Universitário
IH	Infecção Hospitalar
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecção do Trato Urinário
ITU-AC	Infecção do Trato Urinário Associado a Cateter Vesical
MR	Microrganismo Resistente
NP	Nutrição Parenteral
PAV	Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VPM	Ventilação Pulmonar Mecânica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Infecção Hospitalar</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Procedimentos Invasivos e Fatores de Risco associados a IRAS</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Colonização</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Microrganismos Multirresistentes</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Local do estudo</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3</b>	<b>CrITÉRIOS de Inclusão e Exclusão</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4</b>	<b>Procedimentos Microbiológicos</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4.1</b>	<i>Coleta de amostras</i> .....	<b>25</b>
<b>4.4.2</b>	<i>Isolamento e identificação fenotípica das bactérias</i> .....	<b>25</b>
<b>4.4.3</b>	<i>Determinação do perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos</i> .....	<b>25</b>
<b>4.4.4</b>	<i>Detecção de ESBL</i> .....	<b>25</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise Molecular</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5.1</b>	<i>Detecção de <math>\beta</math>-lactamases</i> .....	<b>26</b>
<b>4.5.2</b>	<i>Eletroforese em gel de agarose</i> .....	<b>26</b>
<b>4.5.3</b>	<i>Reação em cadeia da polimerase, baseada em sequências repetitivas intergênicas em enterobactérias (ERIC - PCR)</i> .....	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b>Comitê de Ética</b> .....	<b>27</b>
<b>4.8</b>	<b>Apoio Financeiro</b> .....	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Artigo</b> .....	<b>29</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
	<b>ANEXO 1 – PACECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>65</b>
	<b>ANEXO 3 – TERMO DE ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO .....</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO 4 – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>71</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Infecção Hospitalar

A infecção hospitalar (IH) é definida como aquela adquirida logo após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (PAES et al., 2014).

O termo IH vem sendo substituído nos últimos anos pelo termo Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), no qual a prevenção e o controle das infecções passam a ser considerados para todos os locais onde se presta o cuidado e a assistência à saúde. Sendo assim, o hospital não é o único local onde se pode adquirir uma infecção, podendo existir o risco em procedimentos ambulatoriais, serviços de hemodiálise, casas de repouso para idosos, instituições para doentes crônicos, assistência domiciliar (“home care”) e clínicas odontológicas (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014, JESUS; COELHO; LUZ, 2018).

As IRAS têm crescido progressivamente em todo o mundo, sendo considerado um problema de saúde pública. No Brasil, a taxa média de infecção hospitalar é cerca de 15%, enquanto que nos EUA e na Europa é de 10%. No entanto, o índice de infecção hospitalar varia significativamente, pois está diretamente relacionada com o nível de atendimento e complexidade de cada hospital (ANVISA, 2013).

É possível verificar na literatura científica que centenas de milhões de pacientes são afetados pelas IRAS a cada ano em todo o mundo, levando a uma mortalidade muito significativa e a enormes perdas financeiras para os sistemas de saúde. De cada 100 pacientes hospitalizados, 7 em países desenvolvidos e 10 em países em desenvolvimento irão adquirir pelo menos uma IRAS (WHO, 2014).

De acordo com o European Centre for Disease Prevention and Control, de 20% a 30% das IRAS são consideradas preveníveis por meio de programas de controle e higiene intensivos (CDC, 2013).

O paciente é o elo mais importante da cadeia epidemiológica na IH, pois abriga os principais microrganismos, que na maioria dos casos desencadeiam processos infecciosos, que dependem de fatores relacionados ao estado de saúde

do próprio paciente e do estabelecimento de saúde que presta a assistência (PAES et al., 2014).

Vários fatores contribuem para a ocorrência de infecções, que são conhecidos como fatores de risco. Estes fatores podem ser intrínsecos e extrínsecos ao paciente. Os fatores intrínsecos estão relacionados ao paciente/hospedeiro, já os extrínsecos estão relacionados ao meio ambiente. Os principais fatores de risco para que ocorra infecção são: status imunológico, idade (recém-nascidos e idosos são mais vulneráveis), uso abusivo de antibióticos, procedimentos médicos invasivos e imunossupressão (SOUZA et al., 2016).

A infância representa uma fase particularmente vulnerável da vida, prevalecendo a maior susceptibilidade às infecções, em especial, na faixa etária abaixo de 2 anos, visto que o sistema imune encontra-se imaturo. No ambiente hospitalar a criança está exposta a uma grande variedade de microrganismos, uma vez que este ambiente é considerado contaminado. Alguns fatores que propiciam a aquisição de IRAS são internação prolongada, quebra de barreiras de defesa, procedimentos invasivos, cirurgias e desnutrição proteico-calórica (PAGANOTTI et al., 2013).

Entre as diversas faixas etárias pediátricas, destaca-se o recém-nascido, especialmente os prematuros, pois apresentam risco aumentado de infecção e são considerados imunocomprometidos devido à imaturidade do sistema imune (ROSADO et al, 2018).

Na pediatria, as IRAS podem ser recorrentes, principalmente as do aparelho respiratório, em especial as pneumonias. Infecções da corrente sanguínea, infecções da cavidade oral, infecções de pele e tecidos moles também acometem crianças e podem ser causadas por diversos microrganismos, sendo as infecções bacterianas as mais freqüentes (SOARES et al., 2017).

Nos Estados Unidos, um estudo realizado com análise dos dados de 1.003 hospitais entre 2011 a 2014, foi encontrado 20.390 IRAS com presença de 22.323 microrganismos em unidades pediátricas. Entre todas as IRAS, os seguintes patógenos foram responsáveis por mais de 60% dos relatados: *Staphylococcus aureus* (17%), estafilococos coagulase-negativos (17%), *Escherichia coli* (11%), *Klebsiella pneumoniae* e/ou *oxytoca* (9%) e *Enterococcus faecalis* (8%) (LAKE et al., 2018).

## 1.2 Procedimentos Invasivos e Fatores de Risco Associados a IRAS

Um estudo realizado nos Estados Unidos identificou as infecções mais frequentes em UTI, a primeira foi a pneumonia, seguida por infecção do trato urinário (ITU) e infecção de corrente sanguínea, relacionadas diretamente com ventilação mecânica, manipulação de cateter vesical e de cateter central respectivamente (JESUS; COELHO; LUZ, 2018).

A cateterização venosa central é um procedimento muito utilizado em pacientes críticos, os quais demandam assistência à saúde de alta complexidade. O cateter venoso central (CVC) é um sistema intravascular utilizado para fluidoterapia, administração de fármacos, infusão de derivados sanguíneos, nutrição parenteral, monitorização hemodinâmica, terapia renal substitutiva, entre outros. É um dispositivo que pode permanecer no paciente por vários dias, diminuindo o trauma associado às repetidas inserções de um cateter venoso periférico (SANTOS et al, 2014).

A inserção e a permanência do CVC permitem a entrada de microrganismos para a corrente sanguínea através de dois mecanismos principais, o primeiro mecanismo é através da colonização extraluminal, quando os microrganismos contaminantes da pele, provavelmente auxiliados por ação da capilaridade, penetram através da pele durante a instalação do cateter ou nos dias que se seguem. O segundo mecanismo é através da colonização intraluminal, que ocorre quando o microrganismo migra pela corrente sanguínea, por infecções originárias em outro local, como pneumonia, ou, ainda, a infusão de soluções contaminadas (ANVISA, 2017). A entrada dos microrganismos pode acontecer pelo canhão (*hub*) do cateter, ou pelo seu lúmen, através do guia utilizado durante a inserção do cateter, ou durante a manipulação dos conectores ou das linhas de infusão, ou pela administração de soluções intravenosas (ROSADO; ROMANELLI; CAMARGO, 2011).

O acesso vascular para crianças enfermas tornou-se um procedimento importante e indispensável para os pacientes no âmbito hospitalar, a instalação e a possibilidade de sua manutenção por longo prazo, em veias centrais mudaram substancialmente o tratamento e o prognóstico de várias afecções clínicas e cirúrgicas (MESIANO; HAMANN, 2007). Embora o CVC forneça acesso vascular necessário e de modo seguro, a sua utilização coloca os pacientes em risco de

diversas complicações, destacadamente as infecções locais e sistêmicas (ROSADO; ROMANELLI; CAMARGO, 2011).

Alguns fatores extrínsecos ao paciente, como a lavagem das mãos, a identificação de pacientes colonizados e a utilização de precauções de contato são determinantes para evitar a disseminação de microrganismos através dos profissionais de enfermagem, o descumprimento das normas de proteção ao paciente e a não realização de treinamentos dos profissionais, influenciam diretamente no aumento do risco de desenvolvimento das IRAS. Portanto, uma assistência de enfermagem ineficiente ao paciente em uso de CVC pode levar a complicações, como as infecções de corrente sanguínea, o que aumenta o período de internação, a morbimortalidade e os custos da hospitalização (SANTOS et al, 2014).

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), definida como infecção pulmonar diagnosticada após 48 horas de ventilação mecânica, é a segunda causa mais comum de IRAS em pediatria e acarreta aumento de morbidade e mortalidade, além da elevação dos custos hospitalares (ANVISA, 2013). O desenvolvimento da PAV pode ocorrer por diversos fatores, entre eles, a contaminação do tubo endotraqueal, do aparelho umidificador, por aspiração de secreção de vias aéreas ou do conteúdo gástrico, ou através das mãos contaminadas dos profissionais de saúde (MORINEC; JACOBONIC; MACNETT, 2012, AMORIM; GOMES, 2015).

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das causas mais prevalentes das IRAS. As ITUs são responsáveis por 30% das IRAS em pacientes em UTI pediátrica. A ITU relacionada à assistência à saúde associada a cateter vesical (ITU-AC) é qualquer infecção sintomática de trato urinário em paciente em uso de cateter vesical de demora instalado por um período maior que dois dias. A ITU-AC é de grande potencial preventivo, pois muitos pacientes permanecem com o dispositivo além do necessário, apesar das complicações infecciosas, desconforto para o paciente, restrição da mobilidade, traumas uretrais por tração e elevação de custos hospitalares, com prejuízos ao sistema de saúde público e privado (ANVISA, 2017, SANTOS; COELHO; LUZ, 2018). Dados epidemiológicos destacam que em média 10% dos pacientes que foram cateterizados apresentaram bacteriúria no momento do procedimento e dos pacientes que não apresentaram o problema cerca de 10% a

20% desenvolveram bacteriúria durante a permanência com o cateter (JESUS; COELHO; LUZ, 2018).

### **1.3 Colonização**

O processo de colonização ocorre quando há presença de um microrganismo no hospedeiro na ausência de manifestações clínicas e respostas imunológicas no momento do isolamento bacteriano. É mais prevalente em crianças que em adultos e inicia-se após o nascimento, com alta incidência entre um e dois anos de idade, devido à imaturidade imunológica dessa faixa etária (DONKOR, 2013). Após o nascimento, o processo de colonização continua através do contato direto com a mãe, familiares e equipe da unidade neonatal; ou por contato indireto através de objetos inanimados como termômetros, estetoscópios e transdutores. A ocorrência de infecção a partir da colonização depende do grau de imunidade do recém-nascido e da virulência do microrganismo (OPAS, 2017).

A colonização por MR de pele e mucosas em pacientes hospitalizados tem merecido crescente atenção dos serviços de saúde, mas faltam mais estimativas do impacto mundial dessas colonizações. 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; OLIVEIRA, 2017).

Em indivíduos hospitalizados ou imunocomprometidos, particularmente em pacientes que recebem antibioticoterapia, existe além da colonização do trato gastrointestinal, a colonização da orofaringe, do trato urogenital e da pele por enterobactérias, podendo ocorrer infecções secundárias por estes microrganismos (NORCIA et al., 2015).

### **1.4 Microrganismos multirresistentes**

Os MR são aqueles resistentes a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos. Embora os nomes de alguns sugiram resistência a apenas um agente, por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) ou, enterococo resistente à vancomicina (VRE), esses patógenos são geralmente resistentes a todos, exceto a alguns agentes antimicrobianos comercialmente

disponíveis. Os MR são transmitidos pelas mesmas vias que os agentes infecciosos suscetíveis aos antimicrobianos (SIEGEL, 2007).

As IRAS causadas por microrganismos resistentes (MR) são cada vez mais frequentes em hospitais, em especial nas unidades de terapia intensiva (UTI). A gravidade e a extensão das doenças causadas por espécies bacterianas MR, constituem um importante problema mundial, representando grande ameaça para a segurança do paciente (ZARB et al., 2012).

A resistência antimicrobiana é considerada um problema de saúde global, que compromete a efetividade dos antibióticos, inviabilizando o tratamento de infecções comuns, particularmente em relação a determinados agentes patogênicos, como são as enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). A resistência ocorre quando os microrganismos sofrem mutação genética ao serem expostos a drogas antimicrobianas (FRACAROLLI; OLIVEIRA; MARZIALE, 2017; LIMA; FERREIRA, 2013).

O Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (EUA) estima que, anualmente, pelo menos dois milhões de doenças e 23.000 mortes são causadas por bactérias resistentes aos antibióticos, nos EUA (CDC, 2013). Embora o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos seja um fenômeno que ocorre naturalmente, há maior pressão seletiva e disseminação de resistência pelo mau uso de antimicrobianos, programas inadequados ou inexistentes de prevenção e controle de infecções, favorecendo a transmissão da resistência entre os microrganismos e a exposição de indivíduos a MR (BRASIL, 2018).

A resistência aos antimicrobianos pode ser uma característica intrínseca de certas espécies bacterianas, que podem resistir à ação de um tipo de antibiótico como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente de dada espécie, ou pode ser adquirida como resultado de mutações, que podem ocorrer durante a replicação celular ou serem induzidas através de agentes mutagênicos (COSTA; SILVA, 2017).

As UTIs são, os locais onde mais se observam elevados índices de IRAS associadas às bactérias MR. O perfil de gravidade dos pacientes, o uso extensivo de antimicrobianos de amplo espectro, a adesão insuficiente dos profissionais às medidas de biossegurança, a sobrecarga de trabalho dos profissionais e, por vezes, a inadequação em recursos humanos contribuem para que as UTIs sejam um

cenário ideal para a emergência e disseminação de bactérias MR (OLIVEIRA; DE PAULA, 2011).

Com o surgimento das bactérias MR e seu impacto negativo na assistência à Saúde, foi publicado o *Guideline* “Precauções e Isolamento: prevenindo a transmissão de agentes infecciosos em serviços de saúde”, trazendo abordagens direcionadas às precauções de contato instituídas para o adequado manejo de pacientes infectados ou colonizados por bactérias MR. As orientações do referido *Guideline* destacam a necessidade de implementação de ações visando maior adesão à vigilância para os MR, aplicação de precauções de contato para pacientes infectados ou colonizados por MR, além de elucidar medidas ambientais, como limpeza e desinfecção do ambiente e equipamentos e terapia de descolonização, quando apropriada (SIEGEL et.al., 2007).

Os principais BGN MR que causam a maioria das infecções em unidades de terapia intensiva, particularmente infecções respiratórias e urinárias são *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. (ANVISA, 2015). São reconhecidos por unanimidade como um dos desafios mais preocupantes no campo de cuidados com a saúde. O seu impacto clínico é ainda mais preocupante nos cuidados neonatais e pediátricos, onde as opções de tratamento são intrinsecamente limitadas (GIUFFRÉ et al., 2016).

Os BGN são causa frequente de doença grave na criança, após o uso generalizado de vacinas contra alguns dos principais microrganismos causadores de doença invasiva, como as vacinas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b e *Streptococcus pneumoniae*, tem-se assistido, em alguns centros, a um aumento do isolamento de microrganismos gram negativos (HERZ et al., 2016)

As opções quimioterápicas disponíveis para o tratamento de infecções invasivas por BGN foram comprometidas pelo rápido surgimento de mecanismos de resistência antimicrobiana. Particularmente preocupante é a capacidade de BGN acumularem mecanismos de resistência cruzada às classes de antimicrobianos comumente usadas, o que culminou na circulação de cepas multirresistentes. A maior complexidade do paciente, com o conseqüente aumento do tempo de internação hospitalar e maior necessidade de dispositivos intravasculares, aumentou o risco de infecções hospitalares por BGN (BEREZIN et al., 2014).

Cepas extremamente resistentes a drogas surgiram em vários organismos Gram negativos com resistência a todos os antimicrobianos comumente usados, um

dos principais grupos de mecanismos de resistência em enterobactérias é a produção de enzimas hidrolisadoras de betalactamases. As betalactamases são clinicamente importantes porque conferem resistência aos antimicrobianos mais importantes na prática clínica, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. A perda potencial dessas classes de antibióticos é particularmente significativa na medicina pediátrica, onde as opções de antibióticos são mais limitadas do que nos adultos (NORDMANN, 2014, LUKAC; BONOMO; LOGAN, 2015).

Entre os fatores de risco para infecção por BGN MR relatados, destacam-se o uso de antibióticos nos últimos seis meses, internamento prévio (últimos três meses), cirurgia prévia (últimos 12 meses), presença de doença crônica, presença de imunossupressão e uso de dispositivos invasivos (ventilação invasiva, cateteres centrais, alimentação parenteral e sonda vesical) (MCKIBBEN et al., 2005, VARDAKAS et al., 2013).

A prevenção da resistência antimicrobiana depende de práticas clínicas apropriadas que devem ser incorporadas em todos os cuidados rotineiros do paciente. Estes incluem o uso apropriado de cateteres vasculares e urinários, o diagnóstico exato das etiologias infecciosas, a seleção e a utilização criteriosa dos antimicrobianos (SIEGEL et al., 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando a escassez de dados de colonização por MR na população pediátrica do Brasil e o conhecimento que as bactérias MR têm sido um problema crescente nas unidades pediátricas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a colonização por BGN MR e características dos pacientes colonizados em uma população pediátrica internada em um hospital público de ensino do sul do Brasil.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar a associação entre colonização e infecção relacionada à assistência à saúde por bacilos Gram negativos multirresistentes e determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e genes de resistência de crianças hospitalizadas no Setor de Pediatria do Hospital Universitário de Londrina.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

3.2.1 Descrever as características demográficas e clínicas das crianças em relação à colonização por bacilos Gram negativos multirresistentes e o desenvolvimento de infecção relacionada à assistência à saúde;

3.2.2 Determinar o período para colonização por bacilos Gram negativos multirresistentes;

3.2.3 Identificar as principais espécies de bacilos Gram negativos multirresistentes colonizantes em crianças hospitalizadas;

3.2.4 Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos bacilos Gram negativos isolados de amostras de colonização em crianças hospitalizadas;

3.2.5 Detectar genes de resistência aos antimicrobianos nos bacilos Gram negativos multirresistentes;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local do Estudo

O Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL) é um órgão suplementar da Universidade Estadual de Londrina (UEL), centro de referência para o SUS na região Norte do estado do Paraná, Brasil. Possui 313 leitos, sendo 213 leitos de unidades de internação; 20 de UTI Adulto; 05 de Terapia Intensiva (UTI) Pediátrica; 17 de Cuidados Intermediários Neonatal (UCI Neonatal) e UTI Neonatal, 45 de Pronto Socorro e 16 da Unidade de Queimados. Os setores incluídos neste estudo foram Enfermaria pediátrica e UTI pediátrica.

### 4.2 Delineamento

Os pacientes pediátricos foram acompanhados prospectivamente até o desfecho a partir da admissão em setor pediátrico do HU-UEL. Foram incluídas as crianças hospitalizadas após consentimento dos pais, foram coletados dois *swabs* (nasal, oral, axilar e inguinal e inguinal e retal).

Foi definido como colonizado por BGN MR, o paciente com o primeiro *swab* negativo e que teve *swab* ou cultura microbiológica positiva para bactéria Gram negativa MR na mesma internação. Os pacientes com dois *swabs* ou mais negativos e cultura negativa na mesma internação, foram considerados não colonizados por BGN MR.

Após a definição de casos (pacientes colonizados por BGN MR) e de controles (pacientes não colonizados por BGN MR), foi realizado um estudo caso-controle, para analisar as variáveis: infecção, cateter venoso central (CVC), ventilação pulmonar mecânica (VPM), cateter vesical de demora (CVD) e desfecho.

### 4.3 Critérios de inclusão e exclusão

No período de janeiro a dezembro de 2016, foram internados 687 pacientes internados na Enfermaria da Pediatria e UTI Pediátrica do HU-UEL, foram incluídas todas as crianças de 0 e 12 anos de idade colonizadas por BGN MR naquela internação (n=35). Em 432 crianças não foram coletadas culturas. Em 255 crianças

foram coletadas culturas, destas, 106 foram caracterizadas como grupo de controles, pois apresentavam todas as culturas negativas para BGN MR, 149 crianças tiveram culturas positivas, destas, 114 foram excluídas, pois não foi possível definir o momento da colonização e 35 crianças foram caracterizadas como colonizadas por BGN MR, definidas como grupo de casos (Figura 1).

Foram consideradas bactérias Gram Negativas MR *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenem e/ou cefalosporinas de 4ª geração; enterobactérias resistentes a cefalosporinas de 3ª, 4ª geração e/ou monobactâmicos (SIEVERT et al, 2013).

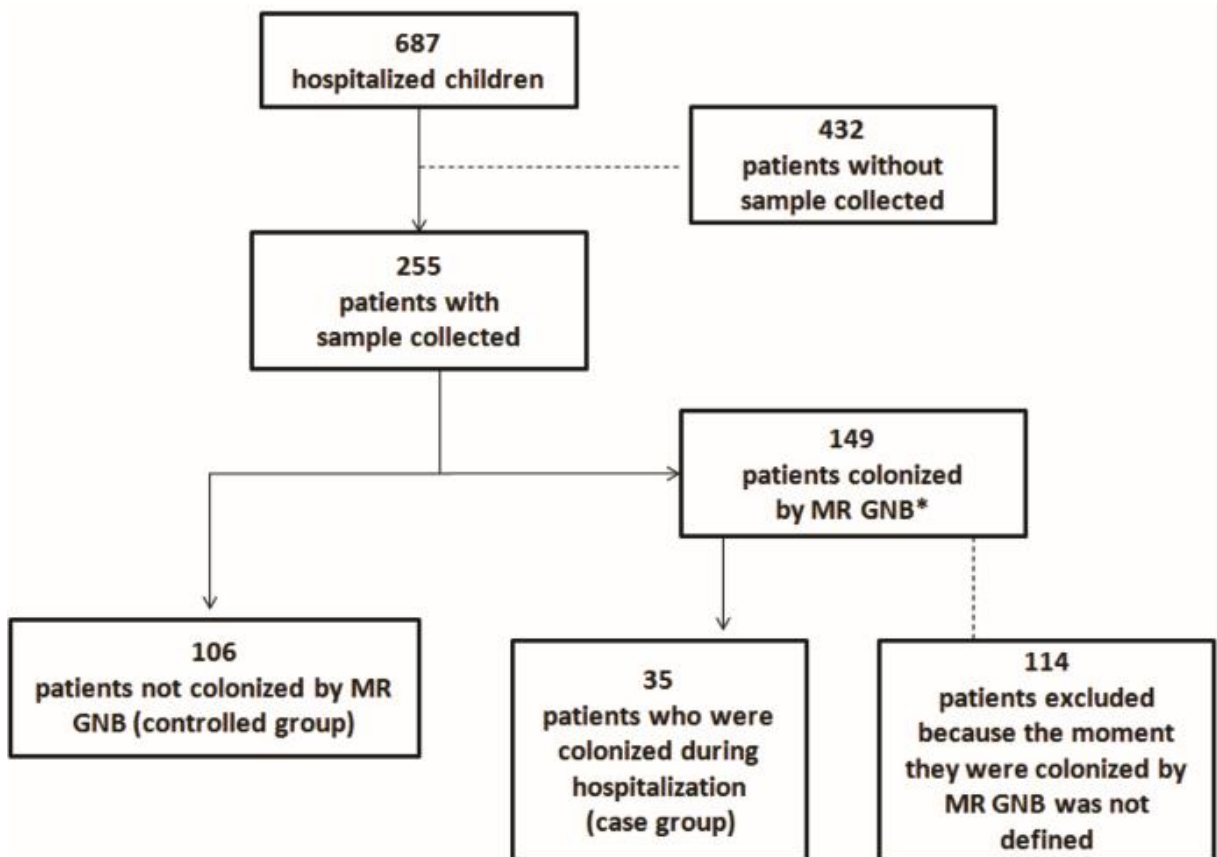


Figura 1: Distribuição dos pacientes do estudo

## 4.4 Procedimentos microbiológicos

### 4.4.1 Coleta das amostras

Foram coletados com técnica asséptica dois tipos de *swabs*: nasal, oral, axilar, inguinal e inguinal-retal. Foram transportados ao laboratório de microbiologia em meio Stuart, no prazo máximo de 4 horas para serem processados.

### 4.4.2 Isolamento e identificação fenotípica das bactérias

As amostras biológicas contidas nos *swabs* foram inoculadas em meios seletivos para cada bactéria alvo do estudo. O isolamento e identificação das bactérias foram realizados de acordo com metodologias padrões (GARRITY; BOONE; CASTENHOLZ, 2001). Concomitantemente, a identificação das espécies foi realizada por método automatizado utilizando a plataforma Vitek® (BioMérieux). As bactérias foram armazenadas em meio de cultivo apropriado contendo 20% de glicerol a -80°C.

### 4.4.3 Determinação do perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

A sensibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos foi analisada pela técnica de disco-difusão conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2018) utilizando discos de antimicrobianos preconizados para cada espécie bacteriana identificada, foram utilizados os seguintes discos: ciprofloxacino (5 mcg), gentamicina (10 mcg), amicacina (30 mcg), sulfametoxazol+tripetropima (25 mcg), cefalotina (30 mcg), amoxicilina (30 mcg), piperacilina + tazobactan (110 mcg), cefoxitina (30 mcg), aztreonam (30 mcg), cefotaxima (30 mcg), ceftazidima (30mcg), cefepime (30 mcg), ertapenem (10 mcg), imipenem (10 mcg), meropenem (10 mcg).

### 4.4.4 Detecção de ESBL

A presença de ESBL foi confirmada pelo teste de duplo-disco aproximação e disco combinado, usando discos da Oxoid<sup>R</sup> (Basingstoke, Hampshire, England). Cepas de *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* 25922 foram usados como controles positivos e negativos, respectivamente (CLSI, 2018).

## 4.5 Análise Molecular

### 4.5.1 Detecção de $\beta$ -lactamases

As amostras que apresentaram o teste fenotípico positivo foram caracterizadas genotipicamente por PCR. Foi realizada a técnica de PCR multiplex, através do TopTaq<sup>®</sup> Master Mix Kit (QIAGEN<sup>®</sup>), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 25 segundos a 94°C de desnaturação, 40 segundos a 52°C para anelamento e 50 segundos a 72°C de extensão e um alongamento final de 6 minutos a 72°C para os genes *bla*<sub>CTX-M1</sub>, *bla*<sub>CTX-M2</sub>, *bla*<sub>CTX-M8</sub>, *bla*<sub>CTX-M9</sub> e *bla*<sub>CTX-M25</sub> (WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006). A PCR para a pesquisa do gene *bla*<sub>CTX-M15</sub> foi realizada de acordo com Leflon-guibout et al., (2004). A reação foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 7 minutos, 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 6 minutos. A PCR para a pesquisa do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi realizada de acordo com Bradford et al. (2004). A reação foi submetida a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A PCR para a pesquisa dos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> foi realizada de acordo com Arlet e Philippon (1991).

### 4.5.2 Eletroforese em gel de agarose

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  $\mu$ L de tampão de amostra. A eletroforese foi realizada a 80 volts, por 40 minutos. O marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen<sup>®</sup>) 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  $\mu$ L/100 mL) por 15min e visualizado em luz ultravioleta.

### 4.5.3 Reação em cadeia da polimerase, baseada em sequências repetitivas intergênicas em enterobactérias (ERIC-PCR).

A reação de PCR foi realizada com os primers ERIC1R (3'CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), à concentração de 50 pmol, 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 Recombinante Brasileira. As reações foram incubadas a 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, usando o termociclador da Applied Biosystems. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA). O aparelho foi ajustado para 100v e 400mA. A análise foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualização em transiluminador com lâmpada ultravioleta e posteriormente fotografado para documentação.

Foi considerado clone com mais de 85% de similaridade genética.

#### **4.6 Análise Estatística**

Os dados foram digitados em banco de dados do Programa Microsoft Office Excell 2007 e a análise estatística foi realizada com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20 para Windows. Foram calculadas, média mediana e desvio padrão das variáveis contínuas. Variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado, e as variáveis contínuas foram analisadas pelo Teste de Mann Whitney. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### **4.7 Comitê de Ética**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina e responde com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 15415413.4.0000.5231 de 22 de abril de 2016 (Anexo1). Todas as mães que tiveram seus filhos internados na Unidade Pediátrica do HUL-UEL foram esclarecidas sobre a pesquisa e convidadas a participar mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Após seu consentimento foram coletadas amostras de *swab* geral (retal, inguinal, axilar, nasal e orofaringe) da criança ainda no ambiente hospitalar.

#### **4.8 Apoio Financeiro**

O presente trabalho foi financiado, pelo CNPQ Número do processo: 444646/2014-0 (Anexo 3). Chamada Universal/2014.

## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos no artigo científico apresentado a seguir, submetido ao periódico Journal of Tropical Pediatrics indexado nas principais bases de dados de saúde.

### 5.1 Artigo

**Avaliação de Colonização por bacilos gram negativos multirresistentes em crianças internadas no sul do Brasil.**

Magalhães SCG<sup>1</sup>; Magalhães GLG<sup>1</sup>; Daga AP<sup>1</sup>; Silva RS da<sup>1</sup>; Danelli T<sup>1</sup>; Fontana LMS<sup>4</sup>; Tacla MTGM<sup>3</sup>; Vespero EC<sup>2</sup>; Kerbauy G<sup>3</sup>; Perugini MRE<sup>2</sup>; Capobiango JD<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas / Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

<sup>3</sup>Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

<sup>4</sup>Hospital Universitário, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

<sup>5</sup>Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

## **Evaluation of Colonization by Multidrug Resistant Gram-Negative Bacilli in Children Hospitalized in Southern Brazil.**

Magalhães SCG<sup>1</sup>; Magalhães GLG<sup>1</sup>; Daga AP<sup>1</sup>; Silva RS da<sup>1</sup>; Danelli T<sup>1</sup>; Fontana LMS<sup>4</sup>; Tacla MTGM<sup>3</sup>; Vespero EC<sup>2</sup>; Kerbauy G<sup>3</sup>; Perugini MRE<sup>2</sup>; Capobiango JD<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Graduate Programme in Clinical and Laboratory Physiopathology, Health Sciences Centre, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Nursing, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>4</sup>University Hospital, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>5</sup>Department of Paediatrics and Paediatric Surgery, Londrina State University (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;

### **ABSTRACT**

The colonization of skin and mucosa by multidrug resistant gram-negative bacilli (MR GNB) in hospitalized patients has received increasing attention. We evaluated the colonization by MR GNB to determine the MR GNB antimicrobial susceptibility profile and resistant genes in a paediatric population. A case-control study was carried out, patients considered colonized by MR GNB and patients non-colonized by MR GNB were evaluated. The variables that were compared between the groups were infection, central venous catheter, lung mechanical ventilation, long-term urinary catheter, and outcome. The sensitivity of the bacteria to the antimicrobial agents was analysed by the disc-diffusion technique, and the genetic diversity of the isolates was

analysed by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). Patients with infection had 4 times greater odds of being colonized by MR GNB than non-infected patients. Among children colonized by MR GNB, the presence of an invasive procedure increased the odds of infection by 15 times. In children who were not colonized by MR GNB, the presence of an invasive procedure increased the odds of infection by 4 times. Among the 20 strains of MR GNB analysed, lower resistance was found for ertapenem and amikacin. The most common resistance mechanism was the production of CTXM1 enzymes, followed by CTXM15 and SHV. Colonization by MR GNB was associated with infection in paediatric patients; therefore, measures should be taken to prevent colonization by MR GNB.

**KEYWORDS:** *Enterobacteriaceae*; drug resistance, microbial; cross infection; catheter-related infections

## INTRODUCTION

The colonization process occurs when a microorganism is present in the host in the absence of clinical manifestations and immunological responses at the time of bacterial isolation [1].

In turn, colonization may be the first step of health care-related infection (HCRI), which is acquired soon after admission and manifests during hospitalization or after discharge, when it can be related to hospitalization or hospital procedures [2, 3].

Several factors contribute to the occurrence of HCRI, including the use of invasive device, as central vascular catheters (CVCs) and consequently a greater potential for morbidity and mortality [4].

The risk factors for gram-negative bacilli (GNB) infection are as follows: use of antibiotics in the previous six months, previous hospitalization (last three months), prior surgery (last 12 months), presence of chronic disease, presence of immunosuppression, and invasive device use (invasive ventilation, central catheters, and urinary catheter) [5, 6].

Childhood represents a particularly vulnerable stage of life, with the highest susceptibility to infections, especially in the age group below 2 years, since the immune system is immature. In the hospital environment, the child is exposed to a wide variety of microorganisms that can trigger colonization and infection [7].

In the United States, 1,003 hospitals reported 20,390 HCRI with the presence of 22,323 microorganisms in paediatric units between 2011 to 2014. Among all HCRI, the following pathogens were responsible for more than 60% of those reported: *Staphylococcus aureus* (17%), coagulase-negative staphylococci (17%), *Escherichia coli* (11%), *Klebsiella pneumoniae* and/or *K. oxytoca* (9%), and *Enterococcus faecalis* (8%) [8]. Although the development of antimicrobial resistance is a naturally occurring phenomenon, there is greater selective pressure and dissemination of resistance due to the misuse of antimicrobials and inadequate programmes for infection prevention and control, which favour the transmission of resistance among microorganisms [9].

Multidrug resistant GNB (MR GNB) are unanimously recognized as one of the most troubling challenges in the field of health care. Their clinical impact is even more worrying in neonatal and paediatric care, where treatment options are limited [10].

For the prevention and control of HCRI, it is necessary to establish MR control policies in the institution and standardization of the implementation and maintenance

of invasive devices [11]. The objective of this study was to analyse the association between colonization and HCRI by MR GNB of hospitalized children in the paediatric sector of a university hospital (UH) in southern Brazil.

## **METHODOLOGY**

### ***Design***

This is a prospective case study. A patient was considered to be colonized by MR GNB when his or her first swab was negative and he or she subsequently presented at least one swab or sterile material that was positive for MR GNB during the same hospital stay. Patients with two or more negative swabs and sterile material without MR GNB isolation at the same hospital stay were considered to be non-colonized by MR GNB.

After the definition of cases (patients colonized by MR GNB) and controls (patients not colonized by MR GNB), a case-control study was performed to analyse the variables: infection, central venous catheter (CVC), lung mechanical ventilation (MV), long-term urinary catheter (LTUC), and outcome.

### ***Inclusion and exclusion criteria***

Among 687 patients hospitalized from January to December 2016 at the Paediatric Ward and Paediatric ICU of the UH, all children between 0 and 12 years old who were colonized by MR GNB were included in this study. No cultures were collected for 432 children. Cultures were collected from 255 children, of whom 106 were characterized as the control group. A total of 149 children had positive cultures, of whom 114 were excluded because it was not possible to define the moment of colonization and 35 children were characterized as the case group.

MR GNB included *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* resistant to carbapenem and Enterobacteria resistant to 3rd or 4th generation cephalosporins or monobactams [12].

The infection data were obtained from Hospital Infection records of the Hospital Infection Control Commission (HICC).

### ***Microbiological procedures***

#### ***Sample collection***

Two swabs were collected using the aseptic technique – one swab for nasal, oral, axillary and inguinal regions, and another swab for inguinal and rectal regions. The swabs were transported to the microbiology laboratory in Stuart medium, within a maximum of 4 hours.

#### ***Phenotypic isolation and identification of bacteria***

The biological samples contained in the swabs were inoculated in selective media for each target bacterium of the study. Concurrently, the species were identified using an automated method with the Vitek® platform (BioMérieux). Bacteria were stored in an appropriate culture medium containing 20% glycerol at -80°C.

#### ***Determination of the profile of sensitivity to antimicrobial agents***

The sensitivity of the bacteria to the antimicrobial agents was analysed using the disc-diffusion technique according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standard Institute [13] using the recommended antimicrobial discs. The following disks were used: ciprofloxacin (5 mcg), gentamicin (10 mcg), amikacin (30 mcg), sulfamethoxazole + trimethoprim (25 mcg), cephalothin (30 mcg), amoxicillin (30 mcg), piperacillin + tazobactam (110 mcg), ceftioxin (30 mcg), aztreonam (30

mcg), cefotaxime (30 mcg), ceftazidime (30 mcg), cefepime (30 mcg), ertapenem (10 mcg), imipenem (10 mcg), and meropenem (10 mcg).

### ***ESBL detection***

The presence of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) was confirmed by the double-disc approximation and combined disc test using Oxoid<sup>R</sup> discs (Basingstoke, Hampshire, England). *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* 25922 were used as positive and negative controls, respectively [13].

### ***Molecular analysis***

#### ***DNA extraction***

The DNA was prepared for single polymerase chain reaction (PCR) using the boiling method. Three to five bacterial colonies isolated on tryptic soy broth (TSB) were suspended in 0.5 ml of ultra-pure water and boiled for 10 min, followed by heat shock for 5 min. The suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and the supernatant was used.

#### ***Detection of $\beta$ -lactamases***

Samples that presented positive phenotypic test were characterized genotypically by PCR. Multiplex PCR was conducted using the TopTaq<sup>®</sup> Master Mix Kit (QIAGEN<sup>®</sup>) with the following amplification conditions: initial 5-min denaturation at 94°C; 30 cycles of 25 sec at 94°C denaturation, 40 sec at 52°C for annealing, and 50 sec at 72°C extension; and a final extension of 6 min at 72°C for the *bla*<sub>CTX-M1</sub>, *bla*<sub>CTX-M2</sub>, *bla*<sub>CTX-M8</sub>, *bla*<sub>CTX-M9</sub>, and *bla*<sub>CTX-M25</sub> genes [14]. PCR for the *bla*<sub>CTX-M15</sub> gene was performed according to Leflon-guibout *et al.* [15]. The reaction was subjected to 30 cycles of 94°C for 7 min, 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 6 min. PCR for the *bla*<sub>KPC</sub> gene was performed according

to Bradford *et al.* [16]. The reaction was subjected to 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 1 min, and 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min. PCR for the *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>* genes was performed according to Arlet and Philippon[17].

### ***Agarose gel electrophoresis***

The products of the single PCR were analysed on a 1.0% agarose gel in 1x Tris/Borate/EDTA (TBE) solution. For the agarose gel application, 4 µL of buffer sample was added, and electrophoresis was performed at 80 volts for 40 min. The 100-bp molecular weight marker (Invitrogen®) was applied to the gel to determine the size of the obtained fragments. The gel was then incubated with ethidium bromide solution (0.08 µL/100 mL) for 15 min and visualized under ultraviolet light.

### ***Polymerase chain reaction based on intergenic repetitive sequences in enterobacteria (ERIC –PCR)***

The PCR was performed with primers ERIC1R (3'CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') and ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') at a concentration of 50 pmol, as described by Versalovic *et al.* [18]. The amplification reactions were performed in a final volume of 25 µL with 1X PCR buffer, dNTPs, and Brazilian Taq DNA Recombinant Polymerase. The reactions were incubated at 95°C for 1 min and then 45 cycles at 94°C for 1 min, 52°C for 1 min, and 72°C for 7 min and a final extension at 72°C for 7 min using the Applied Biosystems thermal cycler. The amplification product was subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis with TBE buffer (tris base, boric acid and EDTA). The device was set to 100 V and 400 mA. The analysis was performed by gel staining with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and visualization under a transilluminator with ultraviolet light followed by imaging for documentation.

### **Statistical analysis**

The data were entered into the Microsoft Office Excell 2007 database, and statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA), version 20 for Windows. The means, medians and standard deviations of continuous variables were calculated. Categorical variables were analysed by the chi-square test or Fisher's exact test where appropriate, and continuous variables were analysed by the Mann-Whitney test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### **Ethics committee**

This project was approved by the Ethics Committee on Research involving Human Beings of Londrina State University (UEL), No **15415413.4.0000.5231** of April 22, 2016. All mothers of children who were hospitalized in the Paediatric Units of the University Hospital of the EUL were informed about the research and invited to participate by signing the informed consent form.

### **RESULTS**

Among the 687 inpatients hospitalized from January to December 2016 at the Paediatric Ward and Paediatric UTI of the UH, all children aged between 0 and 12 years who were colonized by MR GNB were included in this study. No cultures were collected for 432 children. Cultures were collected from 255 children, of whom 106 were characterized as the control group. A total of 149 children had positive cultures, of whom 114 were excluded because it was not possible to define the moment of colonization and 35 were characterized as the case group (Figure 1). In the 35 patients in the case group, 40 MR GNB were isolated: 10 samples with *Klebsiella sp* (25%), 11 with *Escherichia coli* (27.5%), 5 with *Enterobacter spp* (12.5%), 4 with *Serratia spp* (10.0%), 1 with *Proteus spp* (2.5%), and 1 with

*Citrobacter* spp (2.5%). In 8 of these patients, 3 *Enterobacter* spp resistant to carbapenems (CR) (7.5%), 2 *Acinetobacter* spp CR (5.0%), 2 *Klebsiella* spp CR (5.0%), and 1 *Serratia* spp CR (2.5%) were isolated (Figure 2).

The demographic and clinical data for the patients who were colonized and not colonized by MR GNB are presented in Table 1. The median age of the patients was 19.8 months (interquartile range [IQR; 25 and 75] 1 - 66 months). The median time of hospitalization was 15 days (IQR [25 and 75] 8 - 31 days). The time to the swab becoming positive was 3 to 51 days, with a median of 9 days (IQR [25 and 75] 6 - 25 days).

Patients with infection were 4 times more likely to present MR GNB colonization when compared to non-infected patients (OR: 4.044; CI 1.696 - 9.647). No differences were found between the groups that were colonized or not colonized by MR GNB in relation to the presence of the procedure ( $p=0.924$ ), type of procedure ( $p=0.954$ ), and outcome ( $p=0.574$ ) (Table 1).

Demographic and clinical data for the patients colonized by MR GNB according to the presence of infection are presented in Table 2. Male subjects were 16% less likely than females subjects to have infection (OR: 0.16, CI 0,36-0.72).

Patients who were colonized and who had undergone an invasive procedure were 15 times more likely to have infection than patients without an invasive procedure (OR: 15.0; CI 1.5-145.2).

Most patients without infection had no invasive procedure, while 42.9% of the patients with infection used MV or LTUC.

All patients colonized by MR GNB were discharged regardless of the presence or absence of infection.

Data from patients who were not colonized by MR GNB according to the presence or absence of infection are presented in Table 3. Non-colonized patients who underwent some type of procedure were 4 times more likely to present infection than patients without any procedure. Regarding the type of procedure, 46.7% of the non-colonized and infected patients underwent MV or LTUC, while 16.5% of the non-infected patients underwent MV, CVC, or LTUC. Only one patient colonized by *Klebsiella* spp had this microorganism isolated in urine, and the patient was considered to have a urinary infection.

Of the 35 patients who were colonized with MR GNB, the molecular study and sensitivity profile of ESBL-producing enterobacteria were performed in 20 representative samples. Among these samples, 4 (20.0%) had *E. cloacae*, 6 (30.0%) had *K. pneumoniae*, 9 (45.0%) had *E. coli*, and 1 (5.0%) had *Citrobacter* spp (Figure 3).

Among the strains analysed, we observed 65% resistance to ciprofloxacin, 40% resistance to sulfamethoxazole trimethoprim and piperacillin-tazobactam, 25% resistance to amikacin, 15% to ertapenem, and 0% resistance to imipenem and/or meropenem.

The genotypic analysis of MR GNB is presented in Figure 3. In 7 samples (35%), the microorganisms presented 3 different resistance enzymes. The CTXM1 enzyme was present in 50% of the samples. Among the 6 samples of *Klebsiella* spp, the SHV enzyme was detected in 5 (83.3%) samples, CTXM1 in 3 (50%) samples, and TEM in 1 (16.7%) sample. In four samples of *Klebsiella* spp, an association of two or more enzymes was detected.

In two samples with ESBL *E. cloacae* isolate, it was not possible to define the enzyme responsible for the combined resistance.

## DISCUSSION

In our study, we observed a high frequency of MR GNB, and the patients presented a median age and frequency of colonization that were higher than those described in the literature. A survey performed with 111 African paediatric patients with a median age of 8 months (IQR 25 and 75: 4 and 14 months) undergoing cardiac surgery identified colonization by ESBL MR GNB in 17 (15%) patients, while 94 (85%) patients were not colonized. However, as in our study, the isolated species were *K. pneumoniae* in 9 (53%) patients, *E. coli* in 6 (35%) patients, and *E. cloacae* in 2 (12%) patients [19]. Lautenbach *et al.* [20] conducted a study in North American adults and found no differences between the colonized and non-colonized groups with respect to age and sex. They also showed that colonized patients were more likely than non-colonized patients to have infection, longer hospitalizations prior to infection, and a CVC or urinary catheter.

Research on colonization by ESBL-producing microorganisms in Polish children subjected to cardiac surgery showed colonization in 16% of them [21]. French patients in an intensive care unit (ICU) had 25% colonization by ESBL GNB [22], and hospitalized Korean patients had 28.2% colonization by ESBL GNB [23].

In the present study, patients who were colonized by MR GNB had higher odds of infection; similar results were found by other researchers. Cheikh *et al.* [19] showed that among the patients who were colonized by ESBL, 4 (23.5%) developed postoperative infection; however, only 1% of non-colonized patients developed postoperative infection. The microorganisms that were responsible for the infections in the colonized patients were *K. pneumoniae* (2 patients; 50%) and *E. coli* (2 patients; 50%). The chance of developing infection in colonized patients was 22 times higher than in non-colonized patients (CI 95% 8.37-58.5), and the only non-

colonized patient who developed infection demonstrated infection by ESBL *E. cloacae*.

Another study showed that patients colonized by *E. coli* and *K. pneumoniae* were more likely than the controls to have infection, longer hospitalizations prior to infection, and use of a CVC or urinary catheter [20].

Ben-Ami *et al.* [24] showed that colonized individuals had a higher risk of bacteraemia than non-colonized individuals. Cheikh *et al.* [19] also showed an association between previous colonization with ESBL and the occurrence of infection after surgery in paediatric patients. These results are in agreement with those found in our study, in which patients colonized with MR GNB were 4 times more likely than non-colonized patients to have infection.

Among individuals who were not colonized by MR GNB, the presence of the procedure and type of procedure were associated with the presence of infection. Paediatric patients are naturally more vulnerable to HCRI, but there are potentiating factors such as CVC, bladder catheterization, and mechanical ventilation, which favour the breakdown of natural defence barriers [25, 26]. Soares *et al.* [27] highlighted the high percentage of children with CVC and infection. Therefore, the presence of catheters may facilitate tissue invasion by colonizing MR microorganisms.

Bacterial resistance has been a challenge in clinical practice [28]. Among the treatment options for ESBL MR GNB infections, piperacillin-tazobactam has often been associated with therapeutic failure, necessitating a therapeutic change for carbapenems. In turn, the indiscriminate use of carbapenems has led to their resistance and the need to prescribe new drugs, such as tigecycline, and older drugs, such as colistin [29].

In the present study, the enzyme CTXM was detected in half of the samples with the GNB isolate. The presence of CTXM *E. coli* clones has been associated with severe invasive infections [30]. The most widely found extended spectrum beta-lactamases are CTXM, SHV, and TEM, with increasing KPCs [29,31].

According to Pereira *et al.* [32], among 2563 cases of bloodstream infections from June 2007 to March 2010, GNB was isolated from 49% of the samples, and *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *P. aeruginosa* were the main isolated microorganisms. The resistance of piperacillin-tazobactam ranged from 25-55.6%, and resistance to carbapenems ranged from 2-23%; in our study, 20% of the total samples were resistant to imipenem and/or meropenem (CR). Pereira *et al.* [32] reported that among the isolates of *K. pneumoniae*, the presence of CTXM, and SHV and TEM was 63.6%, 45.4% and 28%, respectively, whereas in our study, 6 samples of *Klebsiella pneumoniae* were isolated, and SHV was detected in most of these samples, followed by CTXM1.

The limitations of the present study include the small number of patients with CVC, the loss of fifteen samples (42.8%) of MR GNB from colonized patients, including samples of CR bacteria, and the impossibility of defining the molecular mechanism of resistance in two *Enterobacter* spp samples from colonized patients.

In conclusion, MR GNB colonization was associated with infection in paediatric patients, and the presence of invasive procedures (MV and LTUC) was a facilitator for infection in children colonized by MR GNB. Therefore, measures should be taken to prevent MR colonization in hospitalized children.

## REFERENCES

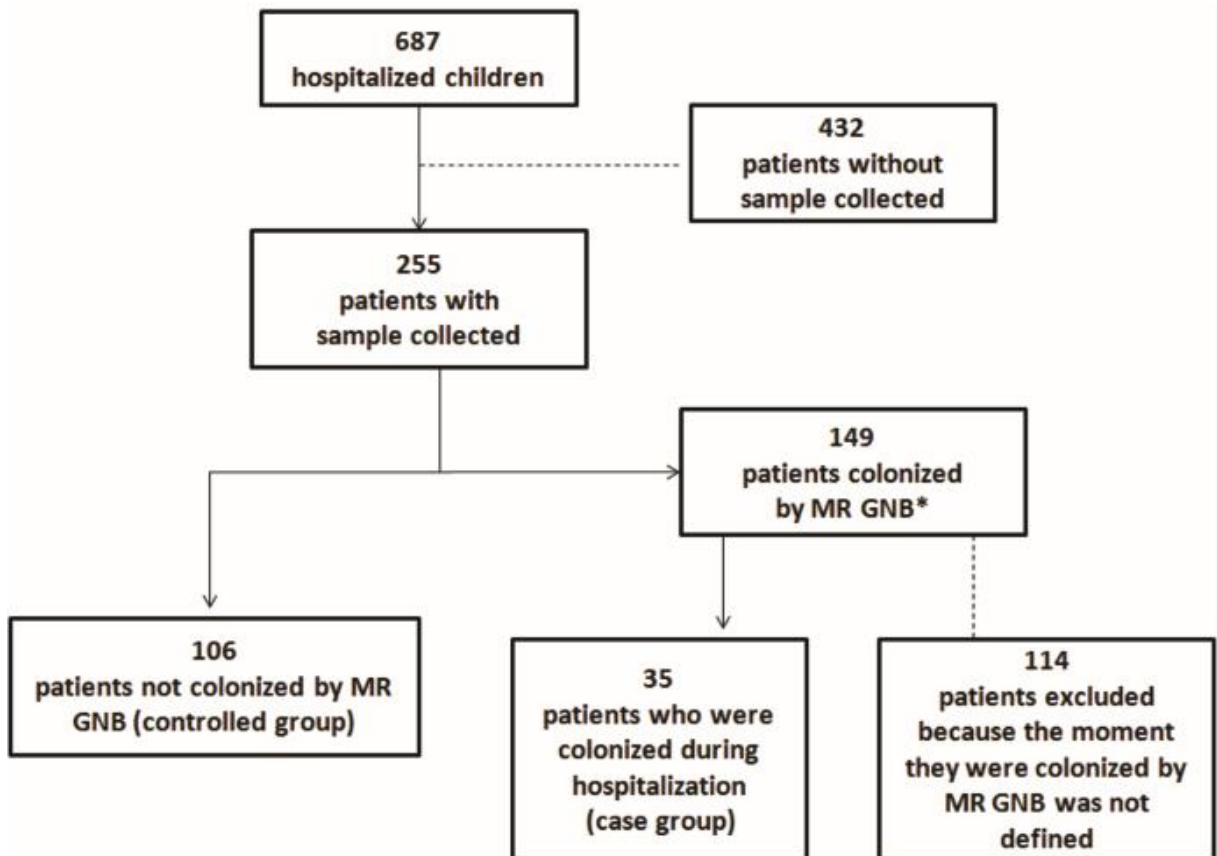
1. Donkor ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:7.
2. Paes ARM, Câmara JT, Santos DAS, *et al.* Epidemiological study of cross infection in Intensive Care. *Rev Enferm UFPI* 2014;3:0-7.
3. Padoveze M C, Fortaleza CMCB. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. *Rev Saude Publica* 2014;48:995-1001.
4. Rosado V, Camargos PAM, Anchieta LM, *et al.* Risk factors for central venous catheter-related infections in a neonatal population systematic review. *J Pediatr* 2018;18:3-14.
5. McKibben L, Horan T, Tokars JI, *et al.* Guidance on public reporting of healthcare-associated infections: Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee. *Am J Infect Control* 2005;33:217-26.
6. Vardakas KZ, Rafailidis PI, Konstantelias AA, *et al.* Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant gram negative bacteria: The study, the patient, the bug or the drug? *J Infect* 2013;66:401-414.
7. Paganotti AM, Reis RA, Crozatti MTL, *et al.* Prescrição de antibióticos a crianças atendidas no inverno em unidade de saúde de município paulista. *Rev Ciênc. Farm Básica Apl* 2013;34(3):441-7.
8. Lake JG, Weiner LM, Milstone AM, *et al.* Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance Among Pediatric Healthcare-Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2011–2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2018;39:1.

9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/20/af-pan-br-17dez18-20x28-csa.pdf> (19 January 2019, date last accessed).
10. Giuffre M, Geraci DM, Bonura C, *et al.* The increasing challenge of multidrug-resistant gram-negative bacilli: results of a 5-year active surveillance program in a neonatal intensive care unit. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95:1–10.
11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Medidas de Prevenção de Infecção da Corrente Sanguínea. Brasília:ANVISA,2017,49-75. <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+4+-+Medidas+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+de+Infec%C3%A7%C3%A3o+Relacionada+%C3%A0+Assist%C3%Aancia+%C3%A0+Sa%C3%BAde/a3f23dfb-2c54-4e64-881c-fccf9220c373> (13 March 2018, date last accessed).
12. Sievert D, Ricks p, Edwards J, *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.2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;34:1-14.

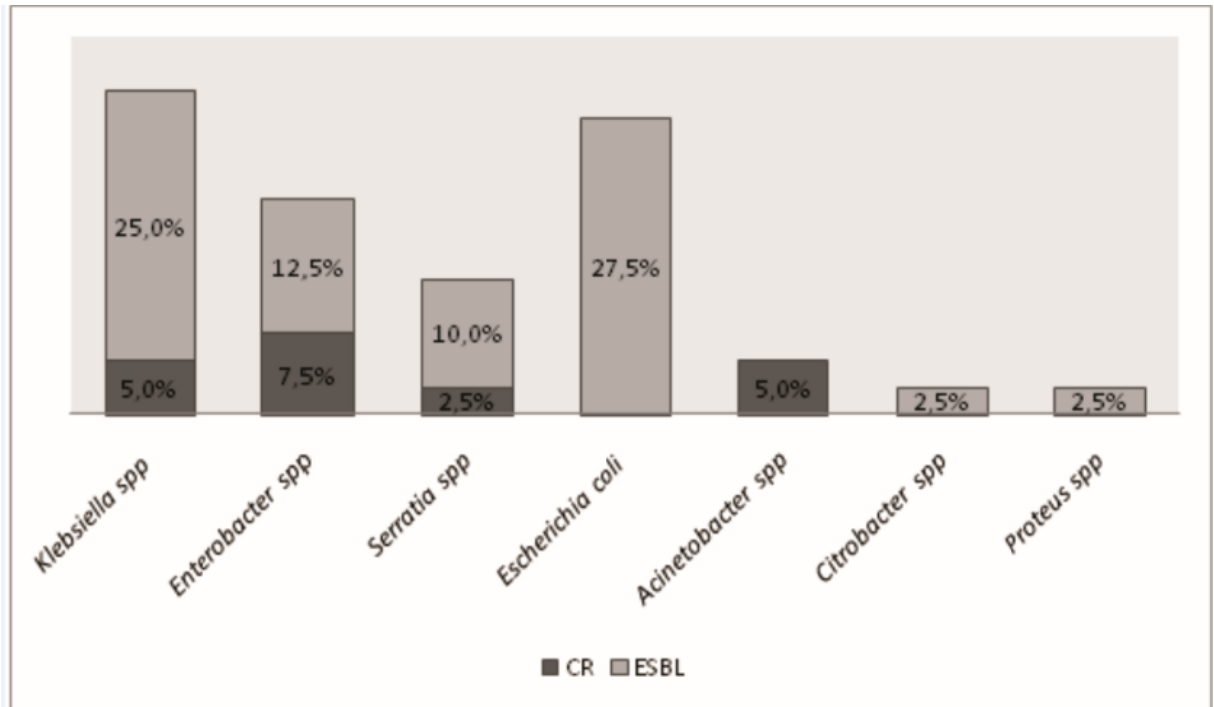
13. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing: Seventh Informational Supplement M 100-S19. CLSI, Wayne, Pennsylvania USA; 2016.
14. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:154-155.
15. Leflon-Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, *et al.* Emergence and spread, of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3736–3742.
16. Bradford PA, Bratu s, Urban C, *et al.* Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30-Lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004;39:55–60.
17. Arlet G, Philippon A. Construction of polymerase chain reaction and use of intragenic Dna probes for thre main types of transferable Beta-lactamases (TEM,SHV,CARB). *FEMS Microbiol Lett.* 1991;66:19-25.
18. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;19:6823-31.
19. Cheikh A, Belefquih B, Chajai Y, *et al.* Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) colonization as a risk factor for developing ESBL infections in pediatric cardiac surgery patients: “retrospective cohort study”. *BMC Infect Dis* 2017;17:1–6.

20. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, *et al.* Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001;32:1162-1170.
21. Jaworski R, Haponiukl, Steffens M, *et al.* Colonization of multidrug resistant pathogens in a hybrid pediatric cardiac surgery center. *Arch Med Sci* 2016;12:639-44.
22. Razazi K, Derde LPG, Verachten M, *et al.* Clinical impact and risk factors for colonization with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 2012;38:1769–78.
23. KO YJ, Moon HW, Hur M, *et al.* Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Korean community and hospital settings. *Infection*. 2013;41:9–13.
24. Ben-Ami R., Schwaber MJ, Navon-VeneziaS *et al.* Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin Infect Dis* 2006;42:925–934.
25. Ramos TP, Silva VCB, Matias LP, *et al.* Perfil de sensibilidade de microrganismos isolados em uroculturas de pacientes com infecção do trato urinário na cidade de Paranavaí-PR. *Arq Ciênc Saúde* 2010;14:111-116.
26. Grillo VT, Gonçalves TG, Campos J, *et al.* Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2013;34:117-123.
27. Soares JHR, Mendes PBS, Tacla MTGM, *et al.* Identificação microbiológica e perfil de resistência a antimicrobianos em crianças hospitalizadas. *Rev Soc Bras Enferm Pediatras* 2017;17:57–63.

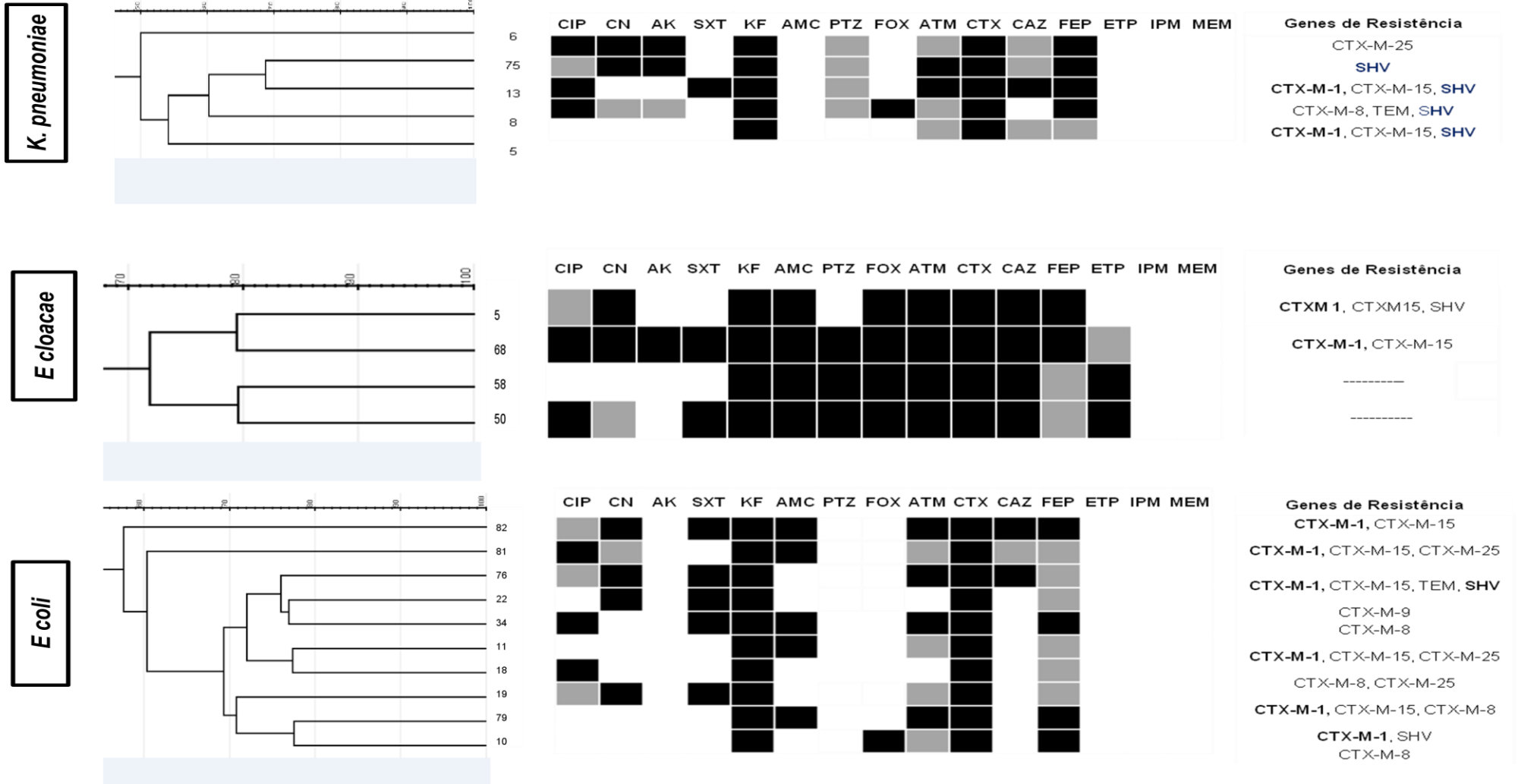
28. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, *et al.* Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48:1-12.
29. Hsu AJ, Tamma PD. Treatment of multidrug-resistant gram-negative infections in children. *Clin Infect Dis* 2014;58:1439-1448.
30. Pitout JD, Laupland KB, Church DL, *et al.* Virulence factors of escherichia coli isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4667–4670.
31. Lukac PJ, Bonomo RA, Logan LK. Extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in children: old foe, emerging threat. *Clin Infect Dis.* 2015;60:1389-1397.
32. Pereira CA, Marra AR, Camargo LF, *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features. *PLoS One* 2013;8:8-13.



**Fig. 1.** Flowchart summary of the study.



**Fig. 2.** Presentation of multidrug resistant gram-negative bacilli (n = 35).



**Fig. 3.** Dendrogram, antimicrobial resistance profile and main resistance enzymes of multidrug resistant gram-negative bacilli  
 CIP: ciprofloxacin, CN: gentamicin, AK: amikacin, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, KF: cephalotin, AMC: amoxicillin, PTZ: piperacillin-tazobactam, FOX: ceftazidime, ATM: aztreonam, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, FEP: cefepime, ETP: ertapenem, IPM: imipenem, MEM: meropenem.  
 ■ Resistant    ■ Intermediary    □ Sensible

**Table 1.** Analysis of the association of colonization by multidrug resistant gram-negative bacilli (MR GNB) with clinical-demographic variables.

Variables	Patients colonized by MR GNB (n=35)	Patients not colonized by MR GNB (n=106)	Odds Ratio (IC 95%)	p
Average age (months)	24.8 (0.2-82.6)	18.5 (1.4-63.6)	-	0.916
Sex				
Female	16 (45.7%)	42 (39.6%)	1.283 (0.594-	0.525
Male	19 (54.3%)	64 (60.4%)	2.773)	
Length of hospital stay (days)	17.0 (10.0- 48.0)	13.5 (8.0-25.5)	-	0.088
Presence of infection				
Yes	14 (40.0%)	15 (14.2%)	4.044 (1.696-	0.001
No	21 (60.0%)	91 (85.8%)	9.647)	
Exposure to invasive procedure				
Yes	7 (20.0%)	22 (20.8%)	0.955 (0.368-	0.924
No	28 (80.0%)	84 (79.2%)	2.473)	
Type of procedure	28 (80.0%)	84 (79.2%)	-	0.954
None	04 (11.4%)	12 (11.3%)		
MV	0 (0.0%)	1 (1.0%)		
CVC	03 (8.6%)	09 (8.5%)		
LTUC				
Outcome				
Discharge	35 (100.0%)	103 (97.2%)	1.029 (0.996-	0.574
Death	00 (0.0%)	3 (2.8%)	1.063)	

MV: mechanical pulmonary ventilation, CVC: central vascular catheter, LTUC: long-term urinary catheter. The categorical data were evaluated by Chi-square or Fisher's Exact. Continuous data were evaluated by Man-Whitney and presented in median and 25% interquartile and 75% interquartile.

**Table 2.** Analysis of the association of infection with the demographic and clinical data of patients colonized by multiresistant gram-negative bacilli.

Variables	Presence of infection (n=14)	Absence of infection (n=21)	Odds Ratio (IC 95%)	p
<b>Sex</b>				
Female	10 (71.4%)	06 (28.6%)	0.16 (0.360-0.715)	0.018
Male	04 (28.6%)	15 (71.4%)		
<b>Exposure to invasive procedure</b>				
Yes	6 (42.9%)	1 (4.8%)	15.0 (1.500-145.200)	0.010
No	8 (57.1%)	20 (95.2%)		
<b>Type of procedure</b>				
None	08 (57.1%)	20 (95.2%)		
MV	2 (14.3%)	1 (4.8%)	-	0.015
CVC	0 (0.0%)	0 (0.0%)		
LTUC	4 (28.6%)	0 (0.0%)		
<b>Outcome</b>				
Discharge	14 (100.0%)	21 (100.0%)	-	-
Death	0 (0.0%)	0 (0.0%)		

MV: mechanical pulmonary ventilation, CVC: central vascular catheter, LTUC: long-term urinary catheter. The categorical data were evaluated by Chi-square or Fisher's Exact and presented.

**Table 3.** Analysis of the association of infection with the demographic and clinical data of patients not colonized by multiresistant gram-negative bacilli.

Variables	Presence of infection (n=15)	Absence of infection (n=91)	Odds Ratio (IC 95%)	p
<b>Sex</b>				
Female	7 (46.7%)	35 (38.5%)	0.714 (0.238-2.140)	0.547
Male	8 (53.3%)	56 (61.5%)		
<b>Exposure to invasive procedure</b>				
Yes	7 (46.7%)	15 (16.5%)	4.43 (1.396-14.089)	0.008
No	8 (53.3%)	76 (83.5%)		
<b>Type of procedure</b>				
None	8 (53.3%)	76 (83.5%)		
MV	3 (20.0%)	10 (11.0%)	-	0.012
CVC	0 (0.0%)	1 (1.1%)		
LTUC	4 (26.7%)	4 (4.4%)		
<b>Outcome</b>				
Discharge	14 (93.3%)	89 (97.8%)	0.32 (0.027-3.704)	0.370
Death	1 (6.7%)	2 (2.2%)		

MV: mechanical pulmonary ventilation, CVC: central vascular catheter, LTUC: long-term urinary catheter. The categorical data were evaluated by Chi-square or Fisher's Exact.

## CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- Não houve diferença de idade e sexo entre as crianças colonizadas e não colonizadas por BGN MR;
- Os pacientes com infecção apresentaram 4 vezes mais chance de colonização por BGN MR, quando comparados aos não infectados;
- Entre as crianças colonizadas por BGN MR a presença de um procedimento invasivo, aumentou em 15 vezes a chance de apresentar infecção, enquanto que para as crianças não colonizadas, a presença de um procedimento invasivo aumentou em 4 vezes a chance de apresentar infecção;
- Entre as cepas de BGN MR analisadas, menor resistência foi encontrada para ertapenem e amicacina, com 100% de sensibilidade ao meropenem e imipenem;
- O mecanismo de resistência mais encontrado foi a produção de enzimas CTXM1, seguido de CTXM15 e SHV.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados desse estudo demonstraram que a colonização por bacilo Gram negativo mutirresistente (BGN MR) foi associado a infecção em pacientes pediátricos. A presença de procedimento invasivo (VPM ou CVD) foi um facilitador para a infecção em crianças colonizadas por BGN MR. Portanto, deve-se utilizar medidas de prevenção da colonização por MR em crianças hospitalizadas.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, M.; GOMES, S. R. Ações de enfermagem para prevenção de infecções associadas à ventilação mecânica na unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista Interdisciplinar do Pensamento Científico**, v. 1, n. 2, p. 6, 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviço de Saúde. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasil, p. 25-35. 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Medidas de Prevenção de Infecção da Corrente Sanguínea**. Brasília: Brasil, p. 49-75, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015**. Brasília: Brasil, 83 p., 2016.

ARCANJO, R.; OLIVEIRA, A. C. Fatores associados a colonização axilar por microrganismo resistente em pacientes na unidade de terapia intensiva. **Revista Atenção Saúde**, v. 15, n. 51, p. 11-17, 2017.

ARLET, G.; PHILIPPON, A. Construction of polymerase chain reaction and use of intragenic Dna probes for three main types of transferable Beta-lactamases (TEM,SHV,CARB). **Fems Microbiology Letters**, v. 66, p. 19-25, 1991.

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

BRADFORD, P. A. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Klebsiella Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 -Lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. 55–60, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)** / Ministério da Saúde, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Centers for Disease Control and Prevention Meeting the Challenges of Drug-Resistant. United States House of Representatives April 23, 2013, 114 p.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing: Seventh Informational Supplement M 100-S19**. CLSI, Wayne, Pennsylvania USA; 2018, 165 p.

COSTA, A. L. P. da C.; SILVA, A. C. S. Jr. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura Macapá. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DONKOR, E.S. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. **Frontier in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n.7, 2013.

FRACAROLLI, I. F.L.; OLIVEIRA, S. A. DE; MARZIALE, M. H. P. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores de saúde: revisão integrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.30, n. 6, p. 651-657, 2017.

GARRITY, G., BOONE, D.R., CASTENHOLZ, R.W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2.ed., 2001, 19 p.

GIUFFRE, M. et al. The increasing challenge of multidrug-resistant gram-negative bacilli: results of a 5-year active surveillance program in a neonatal intensive care unit. **Medicine**, v. 95, n. 10, p. 1–10, 2016.

HERZ, A.M. et al. Changing epidemiology of outpatient bacteremia in 3- to 36-month-old children after the introduction of the heptavalent conjugated pneumococcal vaccine. **The Pediatric Infectious Disease Journal.**, v. 25, n. 4, p. 293-300, 2016.

JESUS, J.S.; COELHO M. F.; LUZ, R.A. Cuidados de enfermagem para prevenção de infecção do trato urinário em pacientes com cateterismo vesical de demora (CVD) no ambiente hospitalar. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 63, n. 2, p. 96-99, 2018.

LAKE, J. G. et al. Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance Among Pediatric Healthcare-Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2011–2014. **Infection Control and Hospital Epidemiology.**, vol. 39, n. 1, 2018.

LEFLON-GUIBOUT, V. et al. Emergence and spread, of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3736–3742, 2004.

LIMA, S. B.; FERREIRA, H. N. Disseminação de Enterobacteriaceae produtoras de beta -lactamases de espectro alargado em crianças. **Nascer e Crescer**. v. 22, p. 87–91, 2013.

LUKAC, P. J.; BONOMO, R. A.; LOGAN, L. K. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae in children: Old foe, emerging threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1389–1397, 2015.

MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n.3, p.268- 281, jul, 2012.

MCKIBBEN, L. et al. Guidance on public reporting of healthcare-associated infections: Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee. **American Journal of Infection Control**, v. 33, p. 217-226, 2005.

MESIANO, E. R.; HAMANN, E. M. Infecção da corrente sanguínea em pacientes em uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva. **Revista Latino Americana Enfermagem**, v. 15, p. 3, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. ANVISA: Brasília, 2004, 381 p.

MORINEC, J.; IACABONI, J.; MACNETT, M. Risk factors and interventions for ventilator-associated pneumonia in pediatric patients. **Journal of Pediatric Nursing**, Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 435-442, 2012.

NORCIA, B. M. M. et al. Pacientes pediátricos portadores de enterobactéria resistente aos carbapenêmicos em um hospital escola do Sul do Brasil. **Journal of Infection Control**., v. 4, n. 1, p. 11–15, 2015.

NORDMANN P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. **Medecine Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 2, p. 51-56, 2014.

OLIVEIRA, A. C.; DE PAULA, A. O. Descalonamento de antimicrobiano e custos do tratamento de pacientes com infecção. **Acta Paulista de Enfermagem**, Belo Horizonte, 68-74, 2011.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Centro Latino-Americano de Perinatologia, Saúde da Mulher e Reprodutiva. **Prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde em neonatologia**. Montevideu:CLAP/SMR-OPS/ OMS, 2017. (CLAP/SMR. Publicação Científica, 1613-03), 114 p.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

PAES, A. R. M. et al. Epidemiological study of cross infection in Intensive Care. **Revista de Enfermagem UFPI**, v.3, p. 0-7, 2014.

PAGANOTTI, A. M. et al. Prescrição de antibióticos a crianças atendidas no inverno em unidade de saúde de município paulista. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 441-447, 2013.

ROSADO, V. et al. Risk factors for central venous catheter-related infections in a neonatal population systematic review, **Journal de Pediatria**, v. 94, n.1, p. 3-14, 2018.

ROSADO, V.; ROMANELLI, R. M. de; CAMARGOS, P. A. M. Risk factors and preventive measures for catheter-related bloodstream infections. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 6, p. 469–477, 2011.

SANTOS, S. F. et al. Ações de enfermagem na prevenção de infecções relacionadas ao cateter venoso central: uma revisão integrativa. **Revista da Sociedade Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirurgico (SOBECC)**, v. 19, n. 4, p. 219-225, 2014.

SANTOS, J. J.; COELHO, M. F.; LUZ, R. A. Cuidados de enfermagem para prevenção de infecção do trato urinário em pacientes com cateterismo vesical de demora (CVD) no ambiente hospitalar. **Arquivos Médicos Hospitalares da Faculdade de Ciências Médicas Santa Casa São Paulo**, v. 63, n. 2, p. 96-99, 2018.

SIEGEL, J. D. et al. Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings. **Infection Control**, p. 1–74, 2007.

SIEVERT, D. 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. 2009-2010. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.34, n.1, p.1-14, 2013.

SOARES, J. H. R. et al. Identificação microbiológica e perfil de resistência a antimicrobianos em crianças hospitalizadas. **Revista da Sociedade Brasileira de Enfermagem Pediátrica**, Londrina, v.17, n.2, p.57–63, 2017.

SOUZA, A. F. L. S. et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares causadas por procedimentos invasivos em unidade de terapia intensiva. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v.2, n.1, p.11-17, 2016.

VARDAKAS, K. Z.. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant gram negative bacteria: The study, the patient, the bug or the drug? **Journal of Infection**, v.66, p.401-414, 2013.

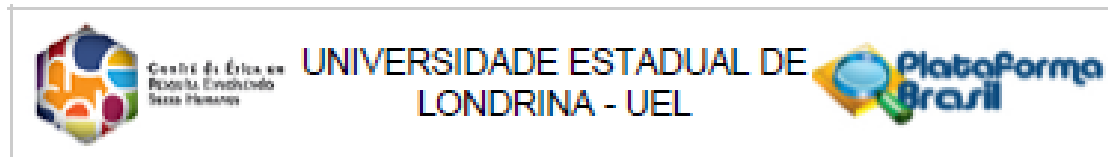
VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.24, p.6823-31, 1991.

WHO, World Health Organization. **Health care-associated infections Fact Sheet. 2014**. Disponível em: [https://www.who.int/gpsc/country\\_work/gpsc\\_ccisc\\_fact\\_sheet\\_en.pdf](https://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf) . Acesso em: 15 dez. 2018.

WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154–155, 2006.

ZARB, P. et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. **Euro Surveillance**, v.17, p. 1-16, 2012.

## ANEXO 1- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Colonização e descolonização por microrganismos multirresistentes do binômio mãe-criança hospitalizado: estudo prospectivo

**Pesquisador:** Gisleneia Kerbauy Lopes

**Área Temática:**

**Versão:** 9

**CAAE:** 15415413.4.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Departamento de Enfermagem

**Patrocinador Principal:** CNPQ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.510.288

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de notificação em forma de emenda que inclui TCLE correspondente à pesquisa com os acompanhantes na etapa qualitativa (descrita no método).

#### Objetivo da Pesquisa:

Sem Alterações.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem Alterações.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem Alterações.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE apresentado para esta fase da pesquisa esclarece o participante da seguinte forma... "Nesse momento, estamos realizando uma das etapas cujo objetivo é o de compreender os sentimentos das mães/pais de filhos portadores de micro-organismo MR que estão em isolamento nas unidades neonatais. Essa pesquisa tem a finalidade de amenizar o impacto que este processo pode ter sobre o vínculo e sentimentos dos pais. A sua participação é muito importante e ela se dará da seguinte forma: você

Endereço: LABESC - Sala 14

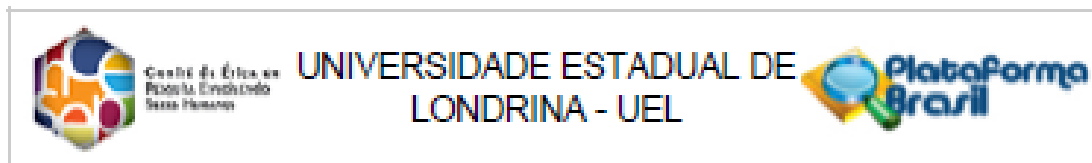
Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-070

UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep288@uel.br



Continuação do Parecer: 1.510.288

receberá um folder com uma explicação sobre o que significa estar em isolamento por microorganismo MR e, se achar necessário, a pesquisadora poderá explicar melhor para você, esclarecendo suas dúvidas. Depois de uma semana, a pesquisadora retornará e realizará uma entrevista individual com você, que deverá ser gravada para posterior transcrição..."

Demais informações de acordo com a resolução 466/12.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PIB_INFORMAÇÕES_BASICAS_689161E3.pdf	30/03/2016 20:23:35		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEquall.pdf	30/03/2016 20:22:02	Gliselena Kerbauy Lopes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TS2016.pdf	04/03/2016 11:43:36	Gliselena Kerbauy Lopes	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AuthU.pdf	03/03/2016 12:00:39	Gliselena Kerbauy Lopes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECPED2016.pdf	03/03/2016 12:00:15	Gliselena Kerbauy Lopes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECNED2016.pdf	03/03/2016 12:00:01	Gliselena Kerbauy Lopes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEAPED2016.pdf	03/03/2016 11:59:39	Gliselena Kerbauy Lopes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLEANED2016.pdf	03/03/2016 11:59:22	Gliselena Kerbauy Lopes	Acelto

Endereço: LABEBC - Sala 14  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970  
 UF: PR Município: LONDRINA  
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep288@uel.br



Centro de Ética em  
Pesquisa, Inovação e  
Bem-Estar Humano

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.510.200

Ausência	TCLEANEO2016.pdf	03/03/2015 11:59:22	Gilselena Kerbauy Lopes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEmenda2016.pdf	17/02/2015 20:23:30	Gilselena Kerbauy Lopes	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CL.pdf	04/10/2015 11:16:07	Gilselena Kerbauy Lopes	Aceito
Folha de Rosto	FR.pdf	25/09/2015 11:39:02	Gilselena Kerbauy Lopes	Aceito
Outros	Notific.pdf	24/09/2015 16:52:50	Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CNPq.pdf	31/08/2015 12:25:55	EDILAINE GIOVANINI ROSSETTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 22 de Abril de 2016

---

Assinado por:  
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli  
(Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-070

UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep200@uel.br

## ANEXO 2 –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### **“Colonização e descolonização por microrganismos multirresistentes do binômio mãe-criança hospitalizado: estudo prospectivo”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“Colonização e descolonização por microrganismos multirresistentes do binômio mãe-criança hospitalizado: estudo prospectivo”**, a ser realizada em **“Hospital Universitário de Londrina”**. O objetivo da pesquisa é **“é identificar se as crianças internados e seus acompanhantes ficam com sua pele colonizada por bactérias que são resistentes a alguns tipos de antibióticos e por quanto tempo isso permanece em seu corpo. Assim chamamos o processo de colonização e descolonização por bactérias, microrganismos multirresistentes (MR) dos acompanhantes das crianças nos setores pediátricos e neonatais”**. Sua participação é muito importante e ela se dará da seguinte forma: No momento da alta, será coletado do acompanhante da criança uma amostra de *swab* geral, cotonete estéril que é friccionado a pele das áreas com maior risco de colonização por bactérias MR (axila, região do procedimento indolor pelo uso de um cotonete da pele com cotonete estéril. Você receberá informação do resultado desse exame em sua casa na primeira semana após a alta hospitalar. Se o resultado do exame for positivo, serão coletadas amostras de *swab* mensais oportunamente na data de algum retorno agendado ou no domicílio do paciente, até o sexto mês após a alta ou a negatificação da cultura do *swab* para bactérias MR.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o maior sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. A amostra de microrganismos coletados pela técnica de *swab* serão descartados após realização dos testes laboratoriais para identificação das cepas bacterianas e seu perfil de patogenicidade e resistência aos antimicrobianos.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são a oferta de um teste laboratorial gratuito que mostra o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos da sua pele e de seu filho. Durante a

hospitalização você pode adquirir bactérias resistentes, e se isso acontecer terá o direito de ser acompanhado pela equipe de pesquisadores deste projeto, que além de orientações colherá exames mensais até confirmada descolonização por esses patógenos. Quanto aos riscos, a sua participação na pesquisa não implicará em nenhum dano, ônus ou prejuízo, sendo a coleta de *swab* um procedimento simples, indolor, podendo causar pequeno desconforto, semelhante a cócegas, durante a fricção do *swab* na pele e mucosa. Ainda assim, garantimos-lhe o direito de encerrar sua participação na mesma a qualquer momento, se assim o desejar, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (GilselenaKerbauly Lopes, fone 3371-2249, Departamento de Enfermagem, Avenida Robert Koch, nº 60 ou por e-mail: gilselena@hotmail.com). Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, 26 de outubro de 2015.

GilselenaKerbauly Lopes

**Pesquisador Responsável**

RG: 34.296.059-3

\_\_\_\_\_,  
tendo sido devidamente esclarecidos sobre os procedimentos da pesquisa,  
concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.

## ANEXO 3 – TERMO DE ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO



1853952409944434

### TERMO DE ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO A PROPOSTA DE NATUREZA CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E/OU DE INOVAÇÃO

Processo: 444646/2014-0  
 Título do Projeto: Colonização e descolonização por microrganismos multiresistentes do binômio mãe-criança hospitalizado: estudo prospectivo.  
 Instituição de Vínculo: Universidade Estadual de Londrina/UEL-PR  
 CNP.J: 78640489000153  
 Instituição de Execução: Universidade Estadual de Londrina  
 CNP.J: 78640489000153  
 Chamada: MCT/CNPq/Universal 14/2014 - Faixa A - até R\$ 30.000,00  
 Eu, Gisleneia Kerbauy Lopes, 310.398.168-60, declaro conhecer, concordar e atender integralmente às exigências N° CPF (ou PASSAPORTE, se estrangeiro) da Chamada acima especificada e às Condições Gerais para Apoio Financeiro que regem a concessão dos recursos especificados abaixo:

#### AUXÍLIO FINANCEIRO

**Custeio:** R\$ 29.970,00

**Valor Global:** R\$ 29.970,00

Tenho ciência:

a) de que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura deste Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente; e

b) das disposições legais e procedimentos para a adequada utilização de recursos financeiros e a correta prestação de contas (Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas).

#### 1. DA CONCESSÃO:

1.1. Ao aceitar o apoio financeiro, o BENEFICIÁRIO declara formalmente:

- a) dedicar-se às atividades pertinentes à proposta aprovada;
- b) observar o disposto nas Leis nº 8.096/93 e nº 10.973/04, nos Decretos nº 93.872/96 e nº 5.563/05 e na Lei nº 8.112/90, no que couber, bem como os demais instrumentos legais pertinentes;
- c) conhecer o Protocolo de Cooperação Técnica firmado entre a instituição de execução do projeto/plano de trabalho e o CNPq, publicado no Diário Oficial da União;
- d) conhecer e cumprir as exigências da Chamada à qual a proposta está relacionada, como também as normas do CNPq, ora em validade, relativas à modalidade de apoio financeiro aprovado, ciente que a eventual mudança dessas normas não afeta, altera ou incide sobre o presente documento, exceto quando proposta pelo CNPq e formalmente aceita pelo BENEFICIÁRIO;
- e) possuir anuência formal da instituição de execução do projeto/plano de trabalho, seja sob a forma de vínculo empregatício ou funcional ou, na ausência deste, sob a forma de declaração de autoridade institucional competente, segundo modelo disponível na página do CNPq na Internet;
- f) dispor das autorizações legais cabíveis de instituições como Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, Fundação do Nacional do Índio - FUNAI, Comitê de Ética na Pesquisa - CEP, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, das Comissões de Ética em pesquisa com animais, Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN e outras, no caso em que a natureza do projeto, as exigir;
- g) manter os documentos referidos nas alíneas "e" e "f" em seu poder até cinco anos após a aprovação final das contas do CNPq

pelo Tribunal de Contas da União, não sendo necessária sua remessa ao CNPq;

h) ter ciência de que esta declaração é feita sob pena de incidência nos artigos [297-299 do Código Penal Brasileiro](#) sobre a falsificação de documento público e falsidade ideológica, respectivamente; e

i) estar ciente que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura do Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente, devendo ser aplicados exclusivamente para a proposta aprovada.

**1.2. O BENEFICIÁRIO compromete-se, ainda, a:**

- a) responsabilizar-se pela adequada implementação e aplicação dos recursos financeiros aprovados, atendendo aos aspectos normativos definidos para a(s) modalidade(s) concedida(s), podendo estar previsto apenas recursos de capital e custeio, como também recursos para bolsas;
- b) utilizar os recursos financeiros em acordo com os critérios e procedimentos estabelecidos no Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas ;
- c) assumir todas as obrigações legais decorrentes de contratações eventuais necessárias à consecução do objeto, não tendo tais contratações qualquer vínculo com o CNPq;
- d) apresentar, nos prazos que lhe forem determinados, informações ou documentos referentes tanto ao desenvolvimento quanto à conclusão do projeto ou plano de trabalho aprovado;
- e) se necessárias, propor alterações ao projeto/plano de trabalho, sujeitas à prévia análise e autorização do CNPq, e de entidade co-financiadora quando for o caso, desde que não se altere o objeto do projeto/plano de trabalho, e não implique remanejamento de despesas entre rubricas (capital para custeio e vice-versa);
- f) permitir e facilitar ao CNPq o acesso aos locais de execução do projeto/plano de trabalho, o exame da documentação produzida e a vistoria dos bens adquiridos;
- g) apresentar o relatório técnico final das atividades desenvolvidas em até 60 (sessenta) dias após o término da vigência do projeto/plano de trabalho, via Plataforma Carlos Chagas;
- h) apresentar a prestação de contas financeira em até 60 (sessenta) dias após o término da vigência do projeto/plano de trabalho, em conformidade com o disposto no Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas, via Plataforma Carlos Chagas; e
- i) se necessário, solicitar prorrogação de prazo de execução do projeto/plano de trabalho, via Plataforma Carlos Chagas, no prazo mínimo de 30 (trinta) dias antes do término da vigência.

**1.3. É vedado**

- a) utilizar o recurso financeiro para fins distintos dos aprovados originalmente na proposta, sendo permitidas despesas exclusivamente com itens financiáveis estabelecidos nas normas de bolsas e auxílios individuais do CNPq, convênios e/ou Chamadas;
- b) transferir a terceiros as obrigações assumidas sem prévia autorização do CNPq;
- c) executar despesas em data anterior à vigência do benefício; e
- d) efetuar pagamento em data posterior à vigência do benefício, salvo se expressamente autorizado pela autoridade competente do CNPq e desde que o fato gerador da despesa tenha ocorrido durante a vigência do Termo de Aceitação. Despesas realizadas fora do prazo de aplicação dos recursos serão glosadas.

## **2. DA GUARDA E DOAÇÃO DOS BENS**

**2.1. O BENEFICIÁRIO e a instituição de execução do projeto responderão pela manutenção do bem em perfeito estado de conservação e funcionamento.**

**2.2. Em caso de roubo, furto ou outro sinistro envolvendo o bem, o BENEFICIÁRIO ou a instituição de execução do projeto, após a adoção das medidas cabíveis, deverá comunicar imediatamente o fato ao CNPq, por escrito, juntamente com a justificativa e a prova de suas causas, anexando cópia autenticada da Ocorrência Policial, se for o caso.**

**2.3. É vedada a transferência dos bens para outro local ou estabelecimento, sem prévia e expressa autorização do CNPq. Todas as despesas decorrentes da transferência dos bens e os eventuais danos causados correrão por conta e risco do BENEFICIÁRIO e da instituição de execução do projeto.**

**2.4. A doação dos bens patrimoniais adquiridos com apoio financeiro do CNPq deverá ser efetuada conforme estabelecido em norma específica e com o disposto no Protocolo de Cooperação Técnica.**

## **3. DA PROPRIEDADE INTELECTUAL / CRIAÇÃO PROTEGIDA**

Caso os resultados do projeto ou o relatório em si venham a ter valor comercial ou possam levar ao desenvolvimento de um produto ou método envolvendo o estabelecimento de uma patente, a troca de informações e a reserva dos direitos, em cada caso, dar-se-ão

de acordo com o estabelecido na Lei de Inovação, nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005 e pela RN-013/2008.

#### 4. DAS PUBLICAÇÕES E DIVULGAÇÃO

4.1. Trabalhos publicados e sua divulgação, sob qualquer forma de comunicação ou por qualquer veículo, de resultados obtidos com recursos do projeto, deverão, obrigatoriamente, no idioma da divulgação, fazer menção expressa ao apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil, bem como mencionar quaisquer outras entidades/órgãos financiadores, especialmente aqueles que participaram no apoio do projeto em conjunto com o CNPq.

4.2. Material de divulgação de eventos, impressos em geral, publicações e a publicidade relativa a eles, de trabalhos e atividades apoiadas ou financiadas pelo CNPq, deverão trazer a logomarca deste em lugar visível, de fácil identificação em escala e tamanho proporcionais à área de leitura. Esclarecimentos a respeito e os padrões a observar devem ser objeto de consulta prévia junto à área de comunicação social do CNPq (comunicacao@cnpq.br).

4.2.1. Os mesmos materiais de divulgação de eventos, impressos em geral, publicações e a publicidade relativa a eles deverão trazer a logomarca de outras entidades/órgãos financiadores, em lugar visível, de fácil identificação, e em escala e tamanho proporcionais à área de leitura. (NR)

4.3. As ações publicitárias atinentes a propostas financiadas com recursos da União deverão observar rigorosamente as disposições contidas no § 1º do art. 37 da Constituição Federal, como também aquelas consignadas em Instrução Normativa da Secretaria de Comunicação de Governo e Gestão Estratégica da Presidência da República.

#### 5. DARESISTÊNCIAE SUSPENSÃO

5.1. Quando o BENEFICIÁRIO desistir da execução do projeto/plano de trabalho, antes do seu início, os recursos serão devolvidos ao CNPq, com justificativa plausível da desistência, no prazo de 30 (trinta) dias de seu recebimento. A não observância desse prazo implicará a correção do valor originalmente concedido, na forma da legislação aplicável aos débitos da Fazenda Nacional.

5.2. O BENEFICIÁRIO deverá comunicar formalmente ao CNPq qualquer descontinuidade do plano de trabalho ou do projeto de pesquisa, acompanhada da devida justificativa. No prazo de 30 (trinta) dias da comunicação da descontinuidade, deverão ser apresentados o relatório técnico e a prestação de contas, como também deverá ser devolvido ao CNPq eventual saldo financeiro. A não observância desse prazo implicará a correção do valor originalmente concedido, na forma da legislação aplicável aos débitos da Fazenda Nacional.

5.3. A liberação dos recursos do apoio financeiro ao projeto/plano de trabalho, bem como de quaisquer outros benefícios aprovados pelo CNPq, será suspensa quando ocorrer uma das seguintes impropriedades, constatada, inclusive, por procedimentos de fiscalização realizados pelo CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT, Secretaria Federal de Controle Interno - SFCI ou Tribunal de Contas da União - TCU:

- a) não comprovação da utilização adequada da parcela anteriormente recebida, na forma da legislação pertinente, quando solicitada;
- b) verificação de desvio de finalidade na utilização dos recursos ou dos bens patrimoniais adquiridos no projeto;
- c) atrasos não justificados no cumprimento das etapas ou fases programadas no projeto/plano de trabalho; e
- d) quando for descumprida qualquer condição deste instrumento.

5.3.1. A suspensão dos benefícios persistirá até a correção da causa verificada.

5.4. O BENEFICIÁRIO, cuja prestação de contas e relatório técnico final do projeto/plano de trabalho, com vigência expirada não forem aprovados, será considerado inadimplente e terá suspenso o pagamento de projetos/planos de trabalho, vigentes, bem como a concessão de novas modalidades de apoio, sem prejuízo de outras medidas julgadas necessárias pelo CNPq e previstas na lei.

#### 6. DAS DISPOSIÇÕES FINAIS

6.1. As presentes condições gerais referem-se a proposta a ser financiada com recursos do CNPq. Se financiada com recursos de outras fontes, poderão prevalecer disposições específicas constantes em Chamadas, Convênios e outros regulamentos pertinentes.

6.2. O Termo de Aceitação só será válido na vigência do Protocolo de Cooperação Técnica firmado entre o CNPq e a instituição de execução do projeto/plano de trabalho, indicada pelo proponente na solicitação.

6.3. O apoio financeiro aprovado pelo CNPq não gera vínculo de qualquer natureza ou relação de trabalho, constituindo doação com encargos feita ao BENEFICIÁRIO.

6.4. O pessoal envolvido na execução do projeto/plano de trabalho, não possuirá vínculo de qualquer natureza com o CNPq e deste não poderá demandar quaisquer pagamentos, sendo estes de inteira responsabilidade do BENEFICIÁRIO/instituição de execução do projeto/plano de trabalho, que o tiver empregado na sua execução.

6.4.1. Se eventualmente o CNPq for demandado pelo pessoal utilizado nos trabalhos, o BENEFICIÁRIO e a instituição de execução do projeto/plano de trabalho, o ressarcirão das despesas que em decorrência realizar, atualizadas monetariamente.

6.5. O processo somente será encerrado após as aprovações do relatório técnico final e da prestação de contas e desde que

cumpridas todas as condições previstas neste instrumento e nas normas aplicáveis.

**6.6.** O descumprimento de qualquer condição constante deste instrumento e a inobservância de dispositivos legais aplicáveis implicará o encerramento imediato do apoio financeiro aprovado e obrigará o BENEFICIÁRIO a ressarcir integralmente o CNPq de todas as despesas realizadas, atualizadas nos termos da legislação, sem prejuízo da aplicação de penalidades cabíveis.

**6.6.1.** A recusa ou omissão do BENEFICIÁRIO, quanto ao ressarcimento de que trata este item, ensejará a consequente abertura de tomada de contas especial e a decorrente inscrição do BENEFICIÁRIO e do débito no Cadastro de Inadimplência Institucional - CADIN e do Tesouro Nacional.

**6.7.** O BENEFICIÁRIO reconhece que ao CNPq compete exercer a autoridade normativa de controle e fiscalização sobre a execução do projeto/plano de trabalho, bem como assumir ou transferir a responsabilidade pela mesma, no caso da paralisação ou de fato relevante que venha a ocorrer, de modo a evitar a descontinuidade das atividades.

## **7. ACEITE**

Declaro ainda que li e aceitei integralmente os termos deste documento, comprometendo-me a cumpri-los fielmente, não podendo, em nenhuma hipótese, deles alegar desconhecimento.

*Termo de aceitação registrado eletronicamente por meio da Internet junto ao CNPq, pelo agente receptor 10.0.2.19(serv255.cnpq.br), mediante uso de senha pessoal do Beneficiário em 20/11/2014, originário do número IP 200.130.33.73(200.130.33.73) e número de controle 5453873954538739.3335243921-3518261870.*

*Para visualizar este documento novamente ou o PDF assinado digitalmente, acesse: <http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?numeroAcesso=1853952409944434>.*

ScholarOne Manuscripts™ Jaqueline Capobiango ▾ Instructions & Forms Help Log Out

**OXFORD** UNIVERSITY PRESS | Journal of Tropical Pediatrics

[# Home](#) [✍ Author](#) [🗉 Review](#)

[Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

## Submission Confirmation



Thank you for your submission

**Submitted to** Journal of Tropical Pediatrics

**Manuscript ID** JTP-2019-098-OP

**Title** Evaluation of Colonization by Multidrug Resistant Gram-Negative Bacilli in Children Hospitalized in Southern Brazil

**Authors** Magalhães, Sílvia  
 Vespero, Eliana  
 Magalhães, Gerusa  
 Daga, Ana  
 Silva, Raquel  
 Lopes, Gilselena  
 Tacla, Mauren  
 Fontana, Louise  
 Danelli, Tiago  
 Perugini, Márcia  
 Capobiango, Jaqueline

**Date Submitted** 10-Mar-2019

SCHOLARONE™



© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2019. All Rights Reserved.  
 ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.  
 ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)