Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Bianca de Oliveira Fonseca

Análise fenotípica e genotípica dos aspectos da virulência e da resistência ao telurito de potássio de amostras bacterianas isoladas de hemocultura de pacientes pediátricos

Rio de Janeiro
2021

Bianca de Oliveira Fonseca

Análise fenotípica e genotípica dos aspectos da virulência e da resistência ao telurito de potássio de amostras bacterianas isoladas de hemocultura de pacientes pediátricos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.ª Dra. Ana Claudia Rosa Ignácio

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F676 Fonseca, Bianca de Oliveira.
Análise fenotípica e genotípica dos aspectos da virulência e da resistência ao telurito de potássio em amostras bacterianas isoladas de hemocultura de pacientes pediátricos / Bianca de Oliveira Fonseca – 2021.
100f.

Orientadora: Ana Claudia Rosa Ignácio.
Coorientador: José Augusto Adler Pereira.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Compostos de potássio – Resistência em microorganismos – Teses. 2. Sangue – Microbiologia – Teses. 3. Infecções bacterianas - Sangue – Teses. 4. Infecção em crianças – Teses. 5. Fatores de virulência – Teses. I. Ignácio, Ana Claudia Rosa. II. Pereira, José Augusto Adler. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 615.015.8:661.832

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Bianca de Oliveira Fonseca

Análise fenotípica e genotípica dos aspectos da virulência e da resistência ao telurito de potássio de amostras bacterianas isoladas de hemocultura de pacientes pediátricos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 26 de julho de 2021.

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Ana Cláudia Rosa Ignácio (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Verônica Dias Gonçalves

Instituto Oswaldo Cruz

_____

Prof.ª Dra. Renata Flávia Abreu da Silva

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Ao querido professor Zé.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por tudo que representa na minha vida.

Aos meus amigos irmãos: Carol, Débora, Robson, Dani, Mila, Zé, Verônica, Renata, Diogo, verdadeiros anjos da guarda.

Ao Ministério da Saúde e aos colegas de trabalho.

Aos pacientes pediátricos oncológicos, eles são os reais super-heróis.

À médica, Ana Lúcia Munhoz, pela amizade, conhecimento compartilhado e dedicação aos seus pequenos pacientes.

À Talita Abreu, Ana Frota, Patrícia Guttmann, Rosana Rangel, pelo aprendizado em Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da UERJ, em especial, Márcia Jones, Denilson, Carla, Rose; professores Mara, Vânia, Alexandre, Robson e Elizabeth.

À professora Ana Cláudia, pelo apoio e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, representado por Alessandra Saliba.

À UERJ.

Às agências de financiamento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Ao professor doutor José Augusto Adler Pereira, mentor, amigo e pai, por me apresentar pela primeira vez o fantástico mundo das bactérias.

Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

FONSECA, Bianca de Oliveira. **Análise fenotípica e genotípica dos aspectos da virulência e da resistência ao telurito de potássio em amostras bacterianas isoladas de hemocultura de pacientes pediátricos.** 2021. 100 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2021.

As Infecções Primárias da Corrente Sanguínea (IPCS) são eventos adversos graves, especialmente para pacientes vulneráveis. Dados de UTIs pediátricas apontam casos de IPCS majoritariamente por *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus,* Complexo *Klebsiella pnemoniae*, *Serratia* spp. e *P. aeruginosa*. Esse trabalho objetivou correlacionar 59 amostras bacterianas, isoladas de hemocultura de 43 pacientes, à resistência aos antimicrobianos e ao K_2TeO_3, além de fatores de virulência em pacientes pediátricos hospitalizados. Do total de pacientes, 20 estavam neutropênicos e 23 não. A análise de dados evidenciou que cateteres de curta permanência foram mais suscetíveis às IPCS que os de longa permanência. As espécies mais frequentes identificadas pelo sistema MALDI-TOF MS, foram SCN (44,2%), *K. pneumoniae* (25,6%) e *E. coli* (18,6%). Aproximadamente, 75% das amostras apresentaram concordância na identificação entre o VITEK® 2 System e o MALDI-TOF MS. Os perfis mais diversos de resistência aos antimicrobianos foram entre as espécies SCN (17 perfis), *K. pneumoniae* (4 perfis) e *E. coli* (3 perfis). Entre os perfis de resistência de SCN, aproximadamente 1/3 exibia marcador para classificá-los como multirresistentes (resistência a OXA). Avaliando o crescimento em meio contendo K_2TeO_3 (25µg/mL e 112µg/mL), três amostras de *E. coli* e uma de *K. pneumoniae* apresentaram essa capacidade. Apenas três amostras de S*taphylococcus,* foram capazes de crescer na concentração de 112 µg/mL. Entre SCN e *S. aureus* foram observadas diferenças no crescimento no meio Vermelho do Congo. As amostras de *K. pneumoniae* foram capazes de produzir biofilme e cinco delas foram positivas para o teste do fio. Entre as amostras de *E. coli*, quatro albergavam genes de virulência relacionados à sideróforos e uma à produção de cápsula. Os resultados evidenciaram que a presença de doença onco-hematológica foi diferencial para hemoculturas positivas em neutropênicos, onde *Staphylococcus epidermidis* foi o principal agente identificado entre as bactérias Gram-positivas e *Klebsiella pneumoniae*, entre as Gram-negativas, que causou mais morbi-mortalidade. Apesar de limitada avaliação de fatores de patogenicidade/virulência e da não investigação de genes de resistência aos antimicrobianos nas cepas analisadas, considera-se que a quimioterapia favorece processos de translocação de bactérias intestinais. A *K.pneumoniae* foi o agente mais frequente nos casos de IPCS, e prováveis alterações podem ser decorrentes de processos de colonização associáveis às diversas internações dos pacientes. A avaliação nas culturas fecais de controle, poderiam incluir, além da pesquisa de cepas multirresistentes, a avaliação de fatores de patogenicidade/virulência através de meios contendo K_2TeO_3 .

Palavras-chave: Infecção de corrente sanguínea. *Staphylococcus sp. Klebsiella pneumoniae. Escherichia coli.* Biofilme. Telurito de potássio.

ABSTRACT

FONSECA, Bianca de Oliveira. **Phenotypic and genotypic analysis of virulence and potassium tellurite resistance aspects of bacterial samples isolated from blood cultures of pediatric patients***.* 2021. 100 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2021.

Bloodstream infections (BSI) are serious adverse events, especially for vulnerable patients. Data obtained from pediatric ICUs indicate cases of BSI mainly due to coagulase-negative *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* complex, *Serratia* spp., and *P. aeruginosa*. This study aimed to correlate 59 bacterial isolates recovered from blood cultures from 43 patients with resistance to antimicrobials and K2TeO3, in addition to virulence factors, in hospitalized pediatric patients. Out of the total, 20 patients were neutropenic and 23 were not. Data analysis showed that short-term catheters were more susceptible to IPCS than long-term catheters. The most frequent species identified by the MALDI-TOF MS system were SCN (44.2%), *K. pneumoniae* (25.6%), and *E. coli* (18.6%). Approximately 75% of the samples showed agreement in identification between the VITEK® 2 System and the MALDI-TOF MS. The most diverse antimicrobial resistance profiles were among the SCN species (17 profiles), *K. pneumoniae* (4 profiles), and *E. coli* (3 profiles). Among the SCN resistance profiles, approximately 13 had a marker to classify them as multiresistant (OXA resistance). Assessing the growth in medium containing K2TeO3 (25 g/mL and 112 g/mL), three samples of E. coli and one of *K. pneumoniae* showed this capacity. Only three *Staphylococcus* samples were able to grow at a concentration of 112 g/mL. Between SCN and *S. aureus*, differences were observed in growth in Congo Red medium. The *K. pneumoniae* samples were able to produce biofilm, and five of them were positive for the wire test. Among the *E. coli* samples, four harbored virulence genes related to siderophores and one to capsule production. The results showed that the presence of onco-hematologic disease was different for positive blood cultures in neutropenics, where *Staphylococcus epidermidis* was the main agent identified among gram-positive bacteria and *Klebsiella pneumoniae* among Gram-negative, which caused more morbimortality. Despite the limited evaluation the pathogenicity/virulence factors and lack of the investigation of antimicrobial resistance genes in the analyzed strains, it is considered that chemotherapy favors translocation processes of intestinal bacteria. *K. pneumoniae* was the most frequent in cases of IPCS, and probable alterations may result from colonization processes associated with the different hospitalizations of these patients. The evaluation of control fecal cultures could include, in addition to the search for multiresistant strains, the evaluation of pathogenicity and virulence factors through media containing K_2TeO_3.

Keywords: Bloodstream Infection. *Staphylococcus sp. Klebsiella pneumoniae. Escherichia coli*. Biofilm. Potassium tellurite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistematização dos critérios diagnósticos para infecção primária de corrente sanguínea laboratorialmente confirmada associada à cateter. ANVISA, 2017..... 40

Figura 2 - Sistematização dos critérios diagnósticos para infecção primária de corrente sanguínea, laboratorialmente confirmada associada a dano de barreira mucosa. ANVISA, 2017..... 41

Figura 3 - Critérios interpretativos do teste de susceptibilidade ao telurito de potássio por gradiente de concentração em ágar..... 46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Genes alvos, iniciadores utilizados e fragmentos pesquisados na PCR para identificação do gene codificante de enterotoxinas nas amostras de *Escherichia coli*..... 49

Quadro 2 - Genes alvos, iniciadores utilizados e fragmentos pesquisados na PCR para identificação do gene codificante da fímbria P nas amostras de *Escherichia coli*..... 50

Quadro 3 - Genes alvos, iniciadores utilizados e fragmentos pesquisados na PCR para identificação do gene codificante do sistema aerobactina de aquisição de ferro nas amostras de *Escherichia coli*..... 51

Quadro 4 - Genes alvos, iniciadores utilizados e fragmentos pesquisados na PCR para identificação do gene codificante da enzima malato desidrogenase, intimina, invasina, plasmídeo enteroagregativo, toxinas Shiga-like 1 e 2, enterotoxinas termolábel e termoestável nas amostras de *Escherichia coli*..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes pediátricos com hemocultura positiva de acordo com faixa etária e presença de neutropenia 54

Tabela 2 - Associação de características relacionadas aos pacientes pediátricos com hemocultura positiva quanto a presença de neutropenia..... 55

Tabela 3 - Associação dos tipos de cateter inserido nos pacientes pediátricos com hemocultura positiva quanto a presença de infecção primária da corrente sanguínea. 56

Tabela 4 - Distribuição das espécies bacterianas recuperadas de hemoculturas de recuperadas de pacientes pediátricos. 57

Tabela 5 - Relação das amostras bacterianas em que houve discrepância entre as metodologias aplicadas na identificação..... 58

Tabela 6 - Perfil de resistência aos antimicrobianos entre as espécies bacterianas recuperadas de hemoculturas recuperadas de pacientes pediátricos..... 60

Tabela 7 - Produção de *slime* e sensibilidade a K_2TeO_3 em amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*..... 61

Tabela 8 - Produção de *slime* e sensibilidade a K_2TeO_3 em amostras de *Staphylocccus* sp. 63

Tabela 9 - Comportamento das amostras de *K. pneumoniae* em relação a formação de biofilme, ao teste do fio e a sensibilidade ao K_2TeO_3..... 64

Tabela 10 - Comportamento das amostras de *E.coli* em relação a formação de *slime*, detecção de genes de virulência e a sensibilidade ao K_2TeO_3..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACT	Ágar Chocolate Telurito
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	*American Type Culture Collection*
BGNNF	Bastonete *Gram* Negativo Não Fermentador
BLAST	*Basic Local Aligment Search Tool*
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CRISPR	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
CVC	Cateteres Venosos Centrais
DEC	*E. coli* intraintestinal diarreiogênica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
EL	Extraluminal
EMAs	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
EUA	Estados Unidos da América
ESBL	*β- lactamases* de espectro estendido
ExPEC	*E. coli* patogênica extraintestinal
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
hvKp	*Klebsiella pneumoniae hipervirulenta*
ICS	Infecção da corrente sanguínea
IL	Intraluminal
IncHI2	Plasmídio do grupo de incompatibilidade do tipo HI2
IPCS	Infecção primária da corrente sanguínea
IPCSL	Infecções Primárias da Corrente Sanguínea com comprovação Laboratorial
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	Sequência de Inserção
MALDI-TOF MS	Espectrometria por ionização e dessorção

MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MDR	*Multidrug Resistance*
MRSA	*Staphylococcus aureus resistentes à meticilina*
MRSE	*Staphylococcus epidermidis resistentes à meticilina*
NCBI	*National Center Biotechonology Information*
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAIs	*Pathogenicity Islands*
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PICC	Cateter venosos central inserido por via periférica
PVL	*Panton-Valentine Leukocidin*
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	*Reactive Oxigen Species*
RT PCR	*Real Time Polymerase Chain Reaction*
SCN	*Staphylococcus Coagulase Negativo*
SCCmec	*Staphylococcus Cassette Chromosome mec*
SCOPE	*Surveillance and Control Pathogens of Epidemiological Importance*
ST	*Sequence type*
TSB	*Tryptic Soy Broth*
TP	*Telurito de Potássio*
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultra violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg/ml	Micrograma por Mililitro
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
ml	Mililitro
pb	Pares de base
mm	Milímetro
min	Minuto
h	Hora
pH	Potencial Hidrogeniônico
nm	Nanômetro
≤	Menor ou igual a
<	Menor que
×	Multiplicação
>	Maior que
+	Positivo
B	Beta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	**OBJETIVOS**	36
1.1	**Geral**	36
1.2	**Específicos**	36
2	**MATERIAL E MÉTODOS**	37
2.1	**Delineamento do estudo e variáveis**.....	37
2.2	**Local do estudo**	37
2.3	**População do estudo e critérios de elegibilidade**	38
2.4	**Seleção das amostras**	39
2.4.1	Coleta de amostras bacterianas isoladas nas hemoculturas na rotina do laboratório de microbiologia da instituição hospitalar.....	39
2.4.2	Acondicionamento das amostras bacterianas.....	41
2.5	**Identificação bacteriana**	42
2.5.1	Identificação bacteriana no laboratório assistencial	42
2.5.2	Identificação bacteriana por espectrometria de massa	42
2.5.3	Identificação bacteriana por sequenciamento de fragmento de DNA	43
2.5.3.1	Obtenção do DNA bacteriano	43
2.5.3.2	Identificação bacteriana por sequenciamento do 16SrDNA	43
2.6	**Teste de susceptibilidade**	44
2.6.1	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	44
2.6.2	Teste de susceptibilidade ao Telurito de Potássio (K_2TeO_3) por diluição em ágar	45
2.6.3	Teste de susceptibilidade ao Telurito de Potássio (K_2TeO_3) por gradiente de concentração em ágar	45
2.7	**Teste qualitativo para detecção de *slime* – Vermelho do Congo**	46
2.8	**Teste do fio**	47
2.9	**Formação de biofilme**	47
2.10	**Reação em cadeia da polimerase (PCR)**	48
2.10.1	Detecção de genes codificantes de cápsula do grupo 2, alfa-hemolisina e fímbria S nas amostras de *Escherichia coli*	48

2.10.2 Detecção de genes codificantes de fímbria P nas amostras de *Escherichia coli* 49
2.10.3 Detecção de genes codificantes do sistema aerobactina de aquisição deferro nas amostras de *Escherichia coli* 50
2.10.4 Detecção de genes codificantes da enzima malatodehidrogenase, intimina, invasina, plasmídeo enteroagregativo, toxina Shiga *like* 1 e 2, enterotoxina termolábil e termoestável nas amostras de *Escherichia coli*..... 51
2.10.5 Análise dos produtos das PCR 52
2.11 **Processamento e análise dos dados** 53
2.12 **Procedimentos éticos**..... 53
3 **Resultados** 54
3.1 **Pacientes** 54
3.2 **Amostras bacterianas** 56
3.2.1 Identificação das amostras bacterianas 56
3.2.2 Identificação bacteriana 57
3.3 **Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos** 59
4 **DISCUSSÃO** 66
CONSIDERAÇÕES FINAIS 81
REFERÊNCIAS 83
ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética 96

INTRODUÇÃO

Uma das metas internacionais de segurança nos Serviços de Saúde é reduzir as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), que são consideradas eventos adversos e de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 36, todas as instituições de saúde do país devem implementar o Núcleo de Segurança do Paciente e a notificação e envio destes eventos adversos são de caráter obrigatório (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). O desenvolvimento de medidas preventivas e estratégias educativas como os *bundles* (pacotes de medidas preventivas com nível de evidência recomendado pela literatura) devem ser implementados e uma das medidas principais é a higienização das mãos. As IRAS estão associadas a elevados custos, aumento no tempo das internações principalmente em pacientes com cateteres de longa permanência que não podem ser removidos (ALONSO *et al.*, 2019, DANG *et al.*, 2019).

IRAS são um grave problema de Saúde Pública em todo o mundo (KHAN, *et al.*, 2017; FACCIOLÀ *et al.*, 2019; FRASER *et al.*, 2020; RAMOS-ZAYAS *et al.*, 2021). Medidas efetivas de prevenção e esforços na formação dos profissionais de Saúde e na prática assistencial, quando reconhecidas, podem reduzir em até 70% algumas das IRAS como, por exemplo, as infecções primárias da corrente sanguínea – IPCSs (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016; HERNÁNDEZ-ACEITUNO *et al.*, 2020).

As IPCSs são uma das IRAS que promove mais complicações, com maior morbidade e mortalidade. Os principais agentes etiológicos destas infecções são cocos Gram positivos, bastonetes Gram negativos e fungos, e as espécies destes microrganismos são capazes de produzir biofilmes robustos na superfície do cateter (ALONSO *et al.*, 2019; DANG *et al.*, 2019).

Devido à subjetividade na classificação das IPCSs, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2008, uniformizou a notificação desta infecção em todo país. De forma prática, as IPCSs foram divididas em infecções com hemocultura positiva, que correspondem às infecções primárias da corrente sanguínea com comprovação laboratorial – IPCSL e em infecções caracterizadas somente por critérios clínicos - infecção primária da corrente sanguínea clínica -

IPCSC (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Atualmente, apesar de as IPCSC não serem infecções de notificação obrigatória em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) de Adultos, Pediátricas e Neonatais, estas devem ser acompanhadas e notificadas nestes setores nas Instituições de saúde (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

As IPCSs são um problema mundial, especialmente para pacientes vulneráveis, como os pacientes pediátricos que possuem especificidades que devem ser consideradas, como taxas mais elevadas de infecção, incluindo maior suscetibilidade relacionada à morbimortalidade e maior tempo de duração das infecções (AMANCIO *et al.*, 2020).

Crianças hospitalizadas e com diagnóstico de câncer, apresentam maior risco de adquirir infecções, principalmente pacientes hemato oncológicos, que necessitam de um período de internação maior, podem se colonizar pela microbiota hospitalar e ainda possuem suas barreiras naturais menos efetivas devido aos efeitos tóxicos da quimioterapia e a imunodepressão causada pelo câncer. Na maioria das situações as infecções estão associadas ao uso de cateteres venosos centrais (CVC) (BÖLL *et al.*, 2021; FU *et al.*, 2016; GOWIN *et al.*, 2020).

Neste contexto pediátrico, destaca-se que pacientes com neoplasias hematológicas têm maior risco de adquirir IPCS, uma vez que são pacientes gravemente imunocomprometidos devido à doença subjacente, à terapia anti-neoplásica e/ou ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (BAIER *et al.*, 2020; HEINZ *et al.*, 2017). Segundo Ziegler (*et al.,* 2015), um estudo de meta-análise realizado em pacientes de UTI sugeriu que a IPCS agrava o curso clínico dos pacientes hemato-oncológicos e contribui para a mortalidade geral. Desta forma, prevenir as IPCS nos pacientes imunocomprometidos é de grande importância (SNARSKI *et al.*, 2015).

Os critérios diagnósticos para notificação das IPCS foram atualizados em 2017. Nesta atualização foi incluído um fluxograma para facilitar a correta identificação do agravo e, pela primeira vez, foi acrescido o conceito de IPCSL confirmada associada a dano de barreira mucosa, em virtude da mucosite associada a algumas modalidades de quimioterapia ou a ocorrência de doença do enxerto contra o hospedeiro, associadas a neutropenia, poderem facilitar a translocação

bacteriana causando Infecção da Corrente Sanguínea - ICS (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Uma das principais características de pacientes imunossuprimidos em tratamento de câncer é a neutropenia (CARVALHO *et al.*, 2020). Este quadro é caracterizado por uma contagem de granulócitos abaixo de 500 células por milímetro cúbico (MOSKALEWICZ *et al.*, 2017). Se essa contagem de glóbulos brancos for acompanhada por episódios febris, com temperaturas superiores à 38ºC, considera-se que o paciente em questão apresenta quadro de neutropenia febril. A emergência de patógenos multirresistentes representa um importante desafio no tratamento de pacientes oncológicos imunossuprimidos e, no que se refere ao contexto pediátrico, está relacionada ao aumento da taxa de mortalidade infantil (KAR *et al.*, 2017).

Pacientes oncológicos pediátricos têm sua sobrevida bastante reduzida em decorrência de complicações graves, sendo a febre a principal razão que os levam a procurar os serviços de emergência pediátrica. Cerca de 0,9% a 39% dos pacientes oncológicos febris não neutropênicos são bacterêmicos e, aproximadamente, 7,3% dos pacientes oncológicos que são admitidos em serviços de emergência apresentam hemoculturas bacterianas positivas. Entre os fatores que favorecem o desenvolvimento de sepse são as infecções do trato respiratório superior, neuroblastoma, outros diagnósticos de câncer e o uso de cateter venoso central (VÁZQUEZ-LÓPEZ *et al.*, 2019).

Ao longo do tempo, os agentes etiológicos da neutropenia febril foram mudando. Bactérias Gram negativas tiveram grande importância na etiologia deste quadro durante a década de 1970, enquanto na década de 1990, as mais associadas foram as Gram positivas, principalmente as relacionadas ao gênero *Staphylococcus*. Mais recentemente, vem sendo notado o predomínio de microrganismos Gram negativos, relacionado a cepas de *Klebsiella* spp. e *E. coli*. Tais alterações epidemiológicas podem ser justificadas pelas diferentes abordagens utilizadas em pacientes oncológicos, tais como utilização profilática de fluoroquinolonas e uso de cateter intravascular. Também não se pode deixar de considerar o aumento na ocorrência de mucosite severa associada ao uso da quimioterapia (CUI *et al.* 2021; KAR *et al.*, 2017; LENDAK *et al.*, 202; MIKULSKA *et al.*, 2014).

Em 2016, o boletim da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mostrou que 75,5% das 33.481 IPCS, notificadas entre janeiro a dezembro de 2015, tiveram confirmação laboratorial, detectadas, em sua maior parte nas UTIs de adultos e nas pediátricas. A avaliação dos dados de IPCSL nas UTIs pediátricas, sem discriminação entre pacientes pediátricos clínicos, cirúrgicos e oncológicos, mostrou que, no ano de 2015, 70,1% das IPCS tiveram confirmação laboratorial (IPCSL). Também, observou-se que entre os principais isolados nessas infecções, 18,7% foram *Staphylococcus* Coagulase Negativo (SCN), seguido 17,8% de *Candida spp*. e 16,3 % de *K. pneumoniae* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

O último Boletim Informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar (RJ), de Junho de 2021, mostrou que foram notificados, até dezembro de 2020, 1954 casos IPCSL em UTIs de adultos, sendo o complexo *K. pneumoniae* e os *Staphylococcus* coagulase negativa os dois principais agentes bacterianos associados, seguidos pelo Complexo *Acinetobacter baumanii-calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em relação aos dados de UTI pediátrica, em 2020, foram notificados 72 casos de IPCSL, entre os quais *Staphylococcus* coagulase negativa, *S. aureus,* Complexo *K. pnemoniae*, *Serratia* spp. e *P. aeruginosa* foram os microrganismos mais envolvidos.

Em um estudo conduzido em hospital pediátrico, no Paraná (Brasil), foi observada a predominância de bactérias Gram positivas nas IPCSL. Entre os achados, *Staphylococcus epidermidis* foi o principal agente identificado. Neste mesmo estudo, bactérias Gram negativas com perfil de resistência aos antimicrobianos foram encontradas em 40% dos casos de infecção, sendo a espécie *Klebsiella pneumoniae* a mais frequentemente isolada (AMANCIO *et al.*, 2020).

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) já foram relatados como sendo a principal causa de IPCSL em pacientes pediátricos (AMANCIO *et al.*, 2020; ÖZALP GERÇEKER *et al.*, 2019). Os SCN são pertencentes à microbiota normal e atualmente são reconhecidos como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos (JAGLIC *et al.*, 2009). Os *Staphylococcus aureus* possuem uma variedade de fatores de virulência que contribuem para a piora do quadro clínico dos pacientes (CHATTERJEE; OTTO, 2013). Atualmente, o número de relatos de casos

de infecções hospitalares causadas por SCN ultrapassou o número causado por *S. aureus* (AMANCIO *et al.*, 2020; BERNARDI, 2005; ÖZALP GERÇEKER *et al.*, 2019).

Os *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negative (SCN) são causadores de infecções associadas a cateteres (PERCIVAL *et al.*, 2015). A identificação de fatores que favorecem a ocorrência de infecção em cateteres é importante para prevenção destas infecções. A heparina que é o principal componente das soluções de *lock* em cateteres de longa permanência tem se mostrado capaz de estimular formação de biofilme em *S. aureus* através de uma via ainda desconhecida, mas relacionada a proteínas ligadoras de heparina na referida espécie. O entendimento desta formação de biofilme, através da heparina, pode auxiliar na escolha de apropriadas soluções de *lock* terapia. Cepas de *S. aureus* podem formar biofilme, nas primeiras 24 horas, após a inserção do cateter, quando estes são mantidos pelo uso de heparina (MISHRA; ORSWILL, 2017).

O estudo *Brazilian* SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) aponta uma taxa de mortalidade de 40% entre pacientes com ICS. Uma possível explicação para esta alta taxa de mortalidade pode residir na etiologia destas infecções. No Brasil, de forma geral em IPCSL, isolados de *K. pneumoniae* e de *Acinetobacter spp.* ocupam, respectivamente, o terceiro e o quarto lugares entre as principais causas da síndrome, situação diferente de outros países, como os EUA, onde nenhum microrganismo Gram-negativo ocupa os quatro primeiros lugares em frequência na etiologia das ICS (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

A espécie *K. pneumoniae* está associada a infecções graves, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, cepas clássicas de *K. pneumoniae* causam infecções nosocomiais graves e descritas em todo o mundo. O recente surgimento e disseminação de cepas de *K. pneumoniae* hipervirulentas ampliaram o número de pessoas suscetíveis a infecções por incluir pessoas saudáveis e imunocompetentes. Este subtipo, com produção elevada de cápsula, pode causar infecções adquiridas na comunidade com risco de morte, como abcesso hepático piogênico, meningite, fasciite necrotizante, endoftalmite e pneumonia grave (SHEN; BAJWA; RUSSO, 2013; PASSET; BRISSE, 2015).

É possível que a colonização intestinal seja determinante para a infecção por cepas hipervirulentas. No entanto, ainda existem fatores a serem descritos sobre

sua patogênese, um deles é a capacidade de disseminação destas cepas pelo corpo. Estas cepas são sensíveis aos antimicrobianos (pan-sensíveis), resistente apenas a ampicilina, ao contrário das cepas clássicas de *K. pneumoniae* que adquirem genes de resistência, como os que codificam Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL) e carbapenemases (PATEL; RUSSO; KARCHMER, 2013).

Um estudo conduzido na Espanha, avaliando a epidemiologia da Infecção da Corrente Sanguínea (ICS) em uma população pediátrica, por um período de dez anos, foi encontrado *Escherichia coli* como microrganismo mais frequentemente isolado em ICS entre as crianças com idade inferior a três meses (FERREIRA *et al.*, 2021).

Em Bangladesh, outro estudo revelou a predominância de bactérias Gram negativas, sendo *Pseudomonas* e, entre as enterobactérias, *E. coli*, seguida por *K. pneumoniae*, os microrganismos mais comuns nos casos de ICS de pacientes pediátricos (CHISTI *et al.*, 2021). No Brasil, segundo o Boletim Informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar - RJ (2021), *E. coli* se encontra entre os quinze principais microrganismos relacionados às IPCSs nas UTIs pediátricas.

E. coli pertence à microbiota intestinal de seres humanos e animais de sangue quente mas podem causar infecções intestinais e extra intestinais em indivíduos em estado de saúde comprometido e imunocomprometidos (CROXEN *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2016; MANGES *et al.*, 2019; MIRSEPASI-LAURIDSEN *et al.*, 2019).

Estas enterobactérias podem ser comensais não patogênicas e patogênicas, sendo classificadas em dois grupos principais denominados *E. coli* intraintestinal diarreiogênica (DEC) e o outro grupo denominado *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) que carregam fatores de virulência que permitem a colonização das mucosas (CROXEN *et al.*, 2013; GALLARDO *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2016; KHAIRY *et al.*, 2019; MANGES *et al.*, 2019; MIRSEPASI-LAURIDSEN *et al.*, 2019; PARAMITA *et al.*, 2020).

Entre os diversos fatores de virulência de *E. coli* podem ser citados fímbrias, cápsula, adesinas, toxinas, hemaglutininas, sideróforo, hemolisina, capacidade de invasão à célula do hospedeiro, entre outros (KADRY; AL-KASHEF; EL´GANINY, 2020).

Os sideróforos são moléculas secretadas que possuem alta afinidade pelo íon férrico, tendo a função de capturar o ferro do ambiente, concentrando-o no citosol bacteriano. Em *E. coli*, este fator de virulência tem sido fortemente associado a cistite, pielonefrite e bacteremia (JOHNSON; STELL, 2000; WILES *et al.*, 2008).

O Ferro (Fe) é essencial para o crescimento e para vias metabólicas de todos os organismos vivos. As células humanas contêm Fe, e este é responsável por várias funções, mas não é encontrado de forma livre e disponível como nutriente em vários ambientes e em hospedeiros animais. Desta forma microrganismos desenvolveram formas de se proteger de efeitos tóxicos e adquirir o Fe, através da produção de sideróforos, e a partir destes conseguem se ligar, sequestrar e transportar o Fe (III) (BENITE, A. M. C. *et al.*, 2002). Várias bactérias entéricas, bactérias patogênicas de humanos, animais, fungos e plantas, microrganismos do solo, cianobactérias, leveduras sintetizam sideróforos (JOHNSON; STELL, 2000; LÜTHJE; BRAUNER, 2014; WILES *et al.*, 2008).

Em *E. coli* existem duas formas de sideróforos: a enterobactina e a aerobactina e o sistema aerobactina é regulado pele gene cromossomal *Fur***.** (BENITE *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2004).

E. coli, como já citado, apesar de pertencer à microbiota intestinal de seres humanos e animais saudáveis, podem causar infecções, devido ao rompimento das barreiras intestinais e capacidade de translocar para outros sítios (GHITA et al., 2020). Além disso, esta espécie se destaca por sua habilidade de transferência horizontal de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos, intra e inter-espécie, inclusive entre gêneros distintos (SONG *et al.*, 2021).

Uma das causas predominante de IPCS ocorre nas primeiras semanas pela colonização extraluminal (EL) devido à formação de biofilmes na face externa do dispositivo. Após este período, no entanto, e principalmente nos cateteres de longa permanência, passa a prevalecer a colonização da via intraluminal (IL), devido ao elevado número de manipulações do *hub* (favorecendo sua contaminação), infusão de soluções contaminadas e a forma mais rara, a colonização da ponta do dispositivo por disseminação hematogênica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Biofilmes são definidos por grupos de microrganismos organizados, envolvidos por uma matriz exopolimérica que os protegem e com a capacidade de

se aderir em superfícies bióticas e abióticas. Podem ser formados por populações de microrganismos de uma única ou de múltiplas espécies (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; MENOITA; TESTAS, 2016).

Geralmente, o biofilme é composto 80% de componentes da matriz exopolimérica e 20% de células bacterianas. Esta matriz determina a estrutura e a integridade do biofilme, age como barreira defensiva contra situações de estresse e contribui para patogenicidade bacteriana, por proteger os microrganismos da fagocitose, do sistema complemento além de redução da suscetibilidade aos antimicrobianos (CORTES; BONILLA; SINISTERRA, 2011; COSTERTON; STEWART, 2001; FLEMING; WINGENDER, 2010; KIM; STEINBERG, 2012).

Biofilmes estão associados a infecções crônicas nos tecidos por se aderirem às superfícies de dispositivos médicos. A dificuldade no tratamento de infecções, associadas a biofilmes, ocorre devido à persistência da infecção, mesmo com a terapia antimicrobiana, pois a própria estrutura e a composição do biofilme confere proteção às células bacterianas, além do mais esta estrutura, também impede, a ação das células da resposta imunológica inata, causando uma reação inflamatória ao redor. Estabelecer o diagnóstico e o tratamento para infecções associadas à biofilme é bastante difícil, visto que a padronização dos exames que os laboratórios clínicos realizam para liberar os resultados de culturas clínicas é realizado em células planctônicas e não em células agregadas em biofilme. Infecções causadas por biofilme como as infecções pulmonares crônicas, sinusites, infecções em feridas crônicas, bem como aquelas associadas a dispositivos médicos como tubos orotraqueais, cateter vesical de demora e, adicionalmente, entre pacientes em uso de cateteres intravenosos, são problemas desafiadores. O tratamento destas infecções tem sido abordado desde de 1996, em conferências entre as sociedades Americanas e Européia de Microbiologia para discutir sobre as infecções causadas por biofilme e desenvolver *guidelines* baseados em evidências para atender a necessidade de tratamento clínico (ESCMID, 2014).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos cateteres centrais, impregnados ou recobertos por substâncias antimicrobianas ou antissépticas para reduzir Infecções Primárias da corrente sanguínea relacionada ao cateter (IPCSRC). Ainda não existem evidências suficientes para justificar a escolha entre um ou outro destes dispositivos em particular. No Brasil, os cateteres impregnados/recobertos CSII (de

segunda geração recoberto com sulfadiazina de prata e clorexidina na face extra e intraluminal) ainda não estão disponíveis em diâmetros compatíveis para uso em pediatria (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). O estudo *Impregnated central venous catheters for prevention of bloodstream infection in children* (CATCH), patrocinado pelo governo inglês, que incluiu 14 UTIs pediátricas da Inglaterra e 1485 pacientes, demonstrou que o uso deste dispositivo reduziu em 75% a incidência de IPCSRC nesta população (GILBERT *et al.*, 2016).

Uma das formas de controlar e minimizar a disseminação de bactérias multirresistentes, e também as sensíveis**,** causadoras de IRAS é usar medidas efetivas de limpeza e desinfecção e de controle para o uso adequado e racional de antimicrobianos. Biocidas incluindo antissépticos e desinfetantes têm sido usados em hospitais e em outras unidades de saúde, com objetivo de evitar a disseminação de microrganismos a partir de superfícies contaminadas. Uma das preocupações também é a relação da resistência aos biocidas associada à multirresistência e a falha na desinfecção com estas substâncias, o que pode levar à disseminação de cepas multirresistentes a antimicrobianos e desinfetantes. O uso de baixa concentração, por diluições inadequadas, pode ser uma possível causa da emergência destes microrganismos multirresistentes (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2016).

A suscetibilidade reduzida a biocidas tem sido descrita em vários patógenos nosocomiais, o que permite supor o envolvimento de genes e mecanismos de resistência para estas substâncias. Assim como a resistência a antimicrobianos, a suscetibilidade reduzida aos biocidas pode ser uma propriedade intrínseca, pode se estabelecer, também, por mutação de genes cromossomais ou por aquisição de material genético por plasmídios ou transposons (genes *qac* e *cepA*). Além disso, poucos estudos têm discutido e analisado os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de biocidas com antimicrobianos, o que é necessário porque, geralmente, os genes de resistência aos biocidas podem estar associados aos genes que codificam mecanismos de resistência (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2018).

Um dos biocidas mais utilizados em hospitais durante a assistência é a clorexidina, cujas soluções de uso tópico utilizadas como antisséptico contém gliconato de clorexidina. Tais soluções são amplamente utilizadas em estabelecimentos de saúde nos procedimentos para preparo de pele que antecedem os procedimentos invasivos, como inserção de cateteres, cirurgias etc. O banho com

clorexidina a 2% é um recurso para evitar infecções recorrentes, em pacientes com idade superior a 2 meses, internados em UTI, em situações especiais, como em unidades com taxas elevadas de IPCS, em pacientes de alto risco para infecção (presença de próteses, imunossupressão grave etc.) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005, 2017).

No Brasil, a segunda causa de morte na população infantil é o câncer e para o seu tratamento é necessário o uso de acessos venosos centrais (CVC). Estes cateteres são imprescindíveis para o tratamento completo desses pacientes, sendo a infecção da corrente sanguínea um dos principais fatores relacionados à perda de funcionalidade de dispositivos venosos (CARVALHO, 2015). As taxas de IPCS também dependem dos tipos de dispositivos que são utilizados e escolhidos para a terapia medicamentosa.

As taxas de infecção são menores quando são utilizados cateteres tunelizados com *cuff*, port totalmente implantados no tecido subcutâneo e cateter venosos central inserido por via periférica (PICC) e cateter tunelizado sem *cuff*, em relação aos cateteres não tunelizados de curta duração. Os PICCs têm sido utilizado frequentemente neste grupo de pacientes, permanecem por um longo tempo e possuem menos complicações em relação a infecção, em comparação aos outros cateteres (BÖLL *et al.*, 2021). Alguns outros estudos em neonatologia mostram que o cateter venoso central apresenta menor risco de infecção que o periférico nesta população (GORSKI *et al.*, 2021; RATCHAGAME; PRABAKARAN, 2021).

O uso frequente de cateteres indica a rotineira avaliação das condições clínicas dos pacientes e do CVC para o diagnóstico das IPCS relacionadas a este dispositivo, e para isto, é necessária a coleta de exames, sendo o mais frequente, a hemocultura. A coleta de hemocultura é amplamente utilizada para o diagnóstico de sepse e IPCS. No entanto, o diagnóstico laboratorial em pacientes com sinais e sintomas de sepse e IPCS causado por agentes etiológicos de diversas espécies bacterianas pode ser difícil, principalmente para neonatos e crianças, sendo necessária a avaliação combinada de aspectos clínicos e suporte laboratorial. Em muitas situações clínicas, a positividade das hemoculturas é baixa, frequentemente menor do que 30%. Alguns pacientes podem apresentar resultados de hemoculturas falso negativos, por uso prévio de antimicrobianos ou por coleta da hemocultura em momentos nos quais não havia bacteremia (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA

SANITÁRIA, 2017).

O uso da biologia molecular para melhoria do diagnóstico destas infecções, por meio da detecção de genes bacterianos rRNA16S, por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e ensaios de *microarray,* pode contribuir muito para a rapidez do diagnóstico. As ferramentas de biologia molecular trazem grandes benefícios para auxiliar no diagnóstico rápido e seguro de agentes etiológicos nas IPCS, mas para implementação desta metodologia, exige-se investimento em recursos que não são acessíveis à maioria das instituições de saúde. Portanto, a implementação e o estudo de recursos bacteriológicos, como a de meios de cultura que possam contribuir para o isolamento e identificação de agentes causadores de IRAS, se fazem necessários. O uso de meios que facilitem a mais precoce detecção de cepas especialmente relevantes em IPCSs, seria de muita importância para o controle de infecções (SHANG *et al.*, 2005).

O Telúrio faz parte de grupo calcogênico da tabela periódica dos elementos químicos, em conjunto com oxigênio, selênio, enxofre e polônio, diferente dos outros elementos que possuem uma função importante bioquímica, biológica e na área médica, o Telúrio não parece ter nenhuma função nos sistemas biológicos, é um elemento pouco explorado, tem classificação química de não metal ou metaloíde mas possue característica física de metal. As características químicas deste elemento são bem similares ao Selênio, em muitas vias, e os mecanismos de compostos do Telúrio ainda não foram completamente desvendados (VÁVROVÁ *et al.*, 2021).

O Telúrio é raro na Crosta terrestre, mas compostos contendo Telúrio têm aumentado como poluentes ambientais, devido atividade industrial e podem aumentar como poluentes no meio ambiente, como em áreas próximas a minas de ouro e também em produtos eletrônicos cobertos por Cobre e outros metais como Ouro e Prata, melhora a viabilidade e protege da corrosão quando associados aos metais. Devido seu uso na indústria (telas de LED, CDs, DVDs e etc) pode causar danos ambientais, não relacionados somente a destruição da ecologia microbiana do solo mas também a riscos à saúde humana (VÁVROVÁ *et al.*, 2021).

Os compostos, do Telúrio podem ser divididos em três grupos: Telurito inorgânico, Telúrio contendo estruturas complexas e organoteluritos. O Telurito de

potássio (K_2TeO_3) é um sal do metaloide, classificado como Telurito inorgânico (VÁVROVÁ *et al.*, 2021).

O uso do K_2TeO_3 em meios de cultura seletivo tem sido utilizado por muitos anos. A resistência ao K_2TeO_3 é comum em várias bactérias Gram negativas e Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp., *Yersinia pestis* e *E. coli* produtora de toxina Shiga (ORTH *et al.*, 2006). Diferentemente do selenito, telurito não foi reconhecido como elemento essencial (*essencial trace elemento*). Embora tenham sido identificados alguns determinantes de resistência ao telurito (Tel^R) em plasmídeos ou no cromossomo de diferentes espécies bacterianas, as bases genética e/ou bioquímica subjacentes à toxicidade do telurito para bactérias são, ainda, pouco compreendidas (CHASTEEN *et al.*, 2009).

Estudos com *E.coli*, através de análises bioquímicas, genéticas, enzimáticas e moleculares, demonstraram pela primeira vez, que a toxicidade do telurito (TeO_3^{2-}) nesta espécie, envolve a formação de superóxido. Esse radical é produzido, pelo menos em parte, pela redução do telurito. Autores consideram, pelas observações durante a redução enzimática *in vitro* do K_2TeO_3, que a resistência ao telurito está relacionada ao gene que codifica a proteína *small heat shock protein*, associada à resistência a superóxido; aos aumentos de: ROS, do conteúdo de carbonilas nas proteínas celulares, da atividade de superóxido dismutase, da transcrição de genes *sod*A, *sod*B e *sox*S e da geração de superóxido (durante a redução enzimática *in vitro* do K_2TeO_3) (PERÉZ *et al.*, 2007).

O K_2TeO_3 tem sido usado, por anos, para o isolamento de patógenos (ZADIK, CHAPMAN; SIDDONS, 1993). Interessante que o grande cientista Alexander Fleming relatou as propriedades antimicrobianas do K_2TeO_3 adicionalmente à penicilina, em artigo de 1932. Posteriormente outros autores sugeriram que a toxicidade ao telurito resultaria, pelo menos em parte, da geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), incluindo H_2O_2. Entretanto, a resistência ao telurito parece ser mediada mais pela resistência ao dano oxidativo do que pela detoxificação do próprio óxido do metalóide (CHASTEEN *et al.*, 2009; PEI *et al.*, 2013; TURNER; WEINER; TAYLOR, 1995; WHITBY *et al.*, 2010).

O gene *ter,* presente no operon *ter*, inicialmente caracterizado no plasmídeo IncHI2 originado de *Serratia marcescens*, parece estar associado à resistência ao K_2TeO_3. Estudo prévio tentou esclarecer a função dos genes *ter* no mecanismo de

resistência ao telurito e, aparentemente, sua ação está relacionada à biorredução dos sais tóxicos de telurito, aparecendo como inclusões de depósitos negros dentro das células resistentes (VALKOVÁ *et al.*, 2007). Em *Pseudomonas syringae*, entretanto, foi descrito um gene cromossômico, uma protease (*tmp*), que codifica uma transferase tiopurina. A proteína *tmp* pode estar envolvida na volatilização do telurito, transformando-o em dimetiltelurito, além de estar envolvida na detoxificação de outras moléculas, como as tiopurinas. Os genes cromossômicos *Yce*C, *Yce*D, *Yce*E e *Yce*F descritos em *Bacillus subtilis*, apresentam homologia com proteínas *ter*Z presentes no plasmídeo R478 (TAYLOR *et al.*, 1999).

O gene *teh*AB (determinante de resistência ao telurito) foi originalmente descrito em *Escherichia coli*. Homólogos foram identificados em *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* e *Corynebacterium glutamicum* (CHASTEEN *et al.*, 2009; PEI *et al.*, 2013). Em *Proteus mirabilis*, a resistência ao telurito se localiza no *locus* cromossômico *ter*ZABCDE, ortólogos dos genes *ter* encontrados em plasmídeos de bactérias entéricas (TAYLOR *et al.*, 1999; TOPTCHIEVA *et al.*, 2003). Análises genotípicas através de PCR, mostram que o gene *ter*B (gene de resistência ao K_2TeO_3), além de outros genes, estão presentes nos plasmídeos de cepas de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulentas (PATEL; RUSSO; KARCHMER, 2013).

O genoma de *E.coli* K12 contém dois genes de resistência ao telurito (*teh*A e *teh*B) que são crípticos em *E.coli*. Estes genes inseridos em plasmídeo de número múltiplo de cópias ou sob forte promotor, expressam resistência a 128 µg/mL de telurito de potássio e, também, quando localizados *upregulation*, tem função de operon (TAYLOR, *et al.*, 1999). O gene *Teh*B parece estar associado a processos de redução, mas não de eliminação, do telurito. O gene *Teh*A que se encontra na membrana, determina efluxo, mas não do telurito. *E. coli* O157 apresenta resistência ao K_2TeO_3 (TORO, *et al.*, 2018) por possível *upregulation* dos genes *teh*A e *teh*B (crípticos) do genoma de *E. coli* (TAYLOR *et al.*, 1999). Desta forma, os genes *teh*A e *teh*B compõem um operon e expressam resistência ao telurito quando estão presentes no genoma em múltiplas cópias. Esta expressão foi verificada, quando ocorreu uma contaminação com DNA cromossômico de *E.coli*, em preparação de DNA plasmidial de alto peso molecular. De outra forma, na condição de genes cromossômicos são fenotipicamente silenciosos (TAYLOR *et al.*, 1994). O alto nível

de resistência ao telurito (CIM = 1024µg/mL) tem sido extensivamente estudado em pMER610 e R478 e tem sido demonstradas associações de resistência com vários genes *ter* (*terZABCDEF*). Este *cluster* também codifica resistência a infecção por vários fagos. Os mecanismos dos genes do *cluster* de resistência ao telurito não são entendidos, assim como as funções das proteínas codificadas por este *cluster*. Várias espécies bacterianas (Gram negativas e Gram positivas) contêm um ou mais genes *ter* (TAYLOR *et al.*, 2002).

Um *cluster* de genes homólogos *terZABCDE* codificados em *E. coli* tem sido identificado. Previamente, foi mostrado que este cluster *terZABCDE* faz parte de uma Ilha de patogenicidade, onde se localizam, também, genes codificando integrases profagos e urease em *E. coli* produtora de toxina shiga EDL933. Estes genes também codificam resistência a infecção por bacteriófagos, assim como proteção contra colicinas. Apesar dos genes *terBCDE* serem suficientes para a resistência ao telurito, suas funções são desconhecidas. Já foi descrito na literatura que a ilha de patogenicidade contendo resistência ao telurito foi adquirida em um único plasmídeo presente em isolados de *E. coli* enterohemorrágicas. Os genes *ter* do plasmídeo pLVPK são adquiridos horizontalmente. Tem sido especulado que os genes *ter* tem outras funções como proteção contra defesas do hospedeiro, assim como manutenção da bactéria. Uma ORF localizada cromossomialmente no qual mostrou 77% de identidade da sequência de aminoácidos com o gene *teh*B de *E. coli* telurito resistente, foi isolada de uma cepa de *K pneumoniae* CG 43. A deleção do gene *teh*B não tinha nenhum efeito aparente na resistência ao telurito, sugerindo que esta resistência seja determinada pelo *cluster* do pLVKP ao invés do homólogo do *teh*B (CHEN, 2004).

A característica fenotípica secundária relacionada à provável resistência ao telurito pode estar relacionada ao favorecimento e auxílio na detecção precoce de cepas com marcadores de resistência aos antimicrobianos em conjunto com a presença de plasmídeos R transferíveis, associados a fatores de risco para colonização por bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar. Meios de cultura contendo antimicrobianos (gentamicina 8µg/ml) ou K_2TeO_3 (25µg/mL) contribuíram para o isolamento de cepas de enterobactérias multirresistentes em pacientes com fatores de risco associado à colonização e risco de infecção e, consequentemente, na busca de elementos genéticos para construção de sondas para rastrear

plasmídeos R. Neste estudo foi marcante o uso do meio contendo telurito para diferenciar cepas comunitárias e hospitalares, de acordo com marcadores de resistência, presença de plasmídeos, associado ao tempo de internação dos pacientes. As prevalências de *Klebsiella pneumoniae* em fezes de pacientes hospitalizados e ambulatoriais foram similares. A média de marcadores de resistência não determinou diferença significativa para os dois ambientes (PEREIRA, 1990).

Em outra abordagem foi verificada, entretanto, que a prevalência de enterobactérias fecais resistentes ao íon telurito foi maior entre pacientes internados há mais de uma semana do que entre aqueles com menos de uma semana. Na segunda etapa de internação o número de marcadores de resistência por cepa foi maior, além de detectarmos uma modificação no espectro de espécies resistentes ao telurito. Sugerindo que tais fenômenos representem a pressão de colonização de microrganismos hospitalares sobre a microbiota fecal de pacientes hospitalizados (MELO *et al.*, 1993).

O uso deste sal do metaloíde em meios de cultura também é importante na detecção de outras espécies bacterianas que apresentem genes de resistência, relacionados à presença de plasmídeos e a outros elementos genéticos móveis, além da virulência. A utilização deste meio no estudo de Pereira (1990) permitiu o isolamento de uma *K. pneumoniae* (401F10) proveniente de fezes, resistente aos aminoglicosídeos e, também, ao K_2TeO_3 e ao mercúrio. De tal cepa foi possível isolar plasmídeo, que após a digestão por enzimas de restrição gerou fragmentos (B2c e B2d) que expressavam resistência à gentamicina (GONÇALVES, 2015; MELO *et al*, 1993; VIEIRA *et al,*1999). O fragmento B2c, originado a partir da digestão de plasmídeo da cepa 401F10, *K. pneumoniae*, possui 777pb e seu sequenciamento mostrou a presença de plasmídeos R, transposase, IS26 e o gene *acc2* que codifica resistência a aminoglicosídeos (GONÇALVES, 2015).

Os IS26 são amplamente disseminados entre plasmídeos e facilitam a mobilização de sequências de cromossomo contendo genes de resistência entre espécies diferentes (HARMER, 2014). Foram descritos transposons compostos de IS26, carreando de um a nove genes de resistência. O IS26 parece facilitar a mobilização de sequências de cromossomo contendo genes de resistência. Os IS26 mediam a cointegração de diferentes replicons; cointegrados que podem ser,

posteriormente, resolvidos por recombinação homóloga dependente de RecA (LEE; HOPKINS; SYVANEN, 1990; MAHILLON; CHANDLER, 1998; NAAS *et al.*, 2001).

Os IS26 são considerados os ISs de maior predominância nos plasmídeos de cepas multirresistentes sem qualquer indicação de especificidade por espécie bacteriana. Possui no único mecanismo de transposição (conservativo e replicativo) a habilidade de reconhecer sua própria sequência como alvo para integração, não controlar o número de cópias e habilidade para mobilizar genes de resistência aos antimicrobianos (REID *et al.*, 2017). As estruturas associadas ao IS26 são semelhantes àquelas encontradas para transposons da classe 1, entretanto, o mecanismo de transposição é diverso (HARMER, 2015).

Existe relação aos plasmídeos de incompatibilidade *Inc*HI2 e integrons, que aumentam a CIM de imipenem por rearranjos mediados pelo IS26 na estrutura de plasmídeos. Neste estudo as cepas resistentes foram selecionadas por meios contendo telurito (30µg/mL) e indica uma relevante (co)ocorrência de IS26 e de genes de resistência ao telurito (LOLI *et al.*, 2006).

A resistência intrínseca ao telurito em *Enterobacteriaceae* é frequentemente mediado por genes plasmidiais e comumente envolve plasmídeos dos grupos de incompatibilidade HI, HII e P (ZADIK CHAPMAN; SIDDONS, 1993). A resistência ao telurito é um marcador de resistência carreado por todos os plasmídeos HI2 (exceto para o R476b) e por todos os plasmídeos *Inc*HII. Plasmídeos do grupo lncPα com amplo espectro de bactérias hospedeiras, carreiam 3 genes em um mesmo operon, todos requeridos para a resistência ao telurito (TAYLOR *et al.*, 1999). Vários estudos têm usado o K_2TeO_3 como marcador preliminar de plasmídeos *Inc*HI2 (TAYLOR, 1999; TAYLOR *et al.*, 2002). Os sequenciamentos de DNA mostram que os genes de resistência aparecem em *clusters* carreados por integrons da classe I, que apesar de não “móveis” estão, comumente, associados a transposons como Tn21, Tn1696 e da família dos Tn3 (MIRIAGOU *et al.*, 2005).

Um primeiro estudo genômico de *E. coli* comensal, no qual foram isoladas cepas resistentes aos antimicrobianos em carne de suínos destinada à comercialização, chama atenção para os rejeitos destes animais como grande fonte de disseminação de genes de resistência e virulência, podendo ser uma especial rota de disseminação da resistência aos antimicrobianos, a partir de elementos genéticos móveis, de grande importância, como já citado o IS26, inseridos em

integrons de classe 1. A seleção destes elementos nestes rejeitos pode ser induzida pelo uso de metais pesados para tratar infecções nestes animais. Esta seleção pode explicar a cadeia de disseminação de resistência entre alimentos, animais, meio ambiente e seres humanos (REID *et al.*, 2017).

As fezes destes suínos podem ser preocupantes poluentes ambientais por carrear genes de resistência aos antimicrobianos e genes determinantes de virulência. Foram detectados genes de resistência a metais pesados *mer*A (69%) e *cus*A (100%) em conjunto ao gene *ter*A (39%) em 98% das cepas testadas, assim como o elemento IS26, frequentemente associado estruturalmente ao integron de classe 1 (REID *et al.*, 2017).

Desta forma, os plasmídeos *Inc*HI2 de multirresistência são de grande interesse. Um estudo mostrou o primeiro relato de co-existência de *oqx*AB, *bla*CTX-M e de operons de outros genes, que codificam resistência ao cobre e prata no mesmo plasmídeo. Adicionalmente, genes de resistência ao mercúrio, ao telurito, ao níquel e a compostos de quaternário foram identificados, além de genes de resistência a vários antimicrobianos. Outros genes foram identificados, assim como o sistema CRISPR correspondente a um sistema imune de proteção do plasmídeo contra ação de bacteriófagos e plasmídeos. Isto pode promover a disseminação de isolados multirresistentes sob pressões seletivas de antimicrobianos, de metais pesados ou por K_2TeO_3 e, também, por radiação UV (FANG *et al.*, 2012; RUTH, HALL, 2007).

Muitos microrganismos desenvolveram diferentes mecanismos para se manterem capazes de resistir a ação do sistema imune primário através de células fagocitárias. A sobrevivência dos microrganismos depende da síntese de proteínas e de outros componentes celulares necessários para se defender e agir contra a ação destas células, como o estresse oxidativo. O *locus ter* parece ser um importante fator de virulência de cepas de *E.coli* patogênicas, representando, desta forma, uma notável contribuição para a adaptação de enterobactérias, permitindo que escapem de uma resposta imune primária do hospedeiro. Foi mostrado que cepas de *E.coli* com o operon *ter* são fagocitadas mais lentamente, mostrando opsonização estendida. Entretanto, uma vez ingerida, as *E. coli* foram capazes de se multiplicar e, mesmo, de destruir os macrófagos. A elevação da resistência dessas bactérias ao estresse oxidativo, dentro dos fagolisossomos, trouxe para as mesmas, vantagem

seletiva nesse microambiente. Isto pode ser a razão porque o operon de resistência ao telurito persista entre vários microrganismos patogênicos, apesar do fato do telúrio ser raro na natureza, e de as bactérias não estarem sob a pressão seletiva do telurito em ambientes naturais. Pode ser que tal resistência seja uma consequência acidental (*adventitious consequence*) e que exista outra função para os genes *ter* que seja mais importante para suas células hospedeiras (VALKOVÁ *et al.*, 2007).

As associações entre virulência e resistência bacteriana devem ser estudadas com maior detalhamento, assim como as relações de expressão de virulência veiculada à mobilidade de elementos genéticos móveis que carreiam genes de resistência aos antimicrobianos. Em particular, quanto ao telurito, cuja resistência está associada à virulência, sabe-se que o único achado óbvio é a visualização de depósitos negros dentro das células resistentes por biorredução dos sais de telurito. Ainda é intrigante a presença do gene *ter,* mesmo na virtual ausência de pressão seletiva do telurito, mas a expressão de resistência ao telurito pode melhorar a adaptação geral de cepas bacterianas, favorecendo suas chances de sobrevivência em eventos de ataque de macrófagos, e assim conferindo uma vantagem seletiva contra a resposta imune inata do organismo hospedeiro (TAYLOR, 1999; VALKOVÁ *et al.*, 2007).

A resistência ao telurito parece ser importante para a sobrevivência microbiana, possivelmente incluindo a resistência aos mediadores tóxicos de macrófagos (TAYLOR, 1999). A presença de determinantes de resistência ao telurito em bactérias patogênicas sugere que estes genes podem trazer vantagens seletivas a sua sobrevivência em alguns ambientes e podem estar associados à patogenicidade. Existem evidências de associações, em plasmídeos, de genes codificando adesinas/toxinas/resistência, entre outras expressões ou características, possivelmente, relacionadas à resistência ao telurito (patogenicidade/resistência a antibióticos) (HARMER, 2016).

Os determinantes de resistência ao telurito em bactérias devem trazer também vantagens seletivas em ambientes naturais. Em *Corynebacterium diphtheriae*, a resistência ao telurito (classicamente reconhecida) apareceu associada a respostas a agentes oxidativos e produtores de radicais livres como o peróxido de hidrogênio e o paraquate (SANTOS *et al*, 2015). Entre 100 isolados de *E.coli* uropatogênicas, duas cepas com maiores CIMs para o telurito, foram

selecionadas para análise genética, através de RT PCR. Sendo assim, foram detectados genes *ter*. Estas duas cepas selecionadas anteriormente, livres do operon, foram transformadas por plasmídeo contendo os genes *ter*W-*ter*F**.** As CIMs das cepas transformadas apareceram elevadas (2,5 vezes e 5 vezes). A aquisição dos genes levou a um aumento de 10% na resistência ao H_2O_2 (VALKOVÁ *et al*, 2007).

Estudos realizados com outras espécies bacterianas, onde foram realizadas mutações produzidas por transposons, que causaram a perda do gene *yce*GH, tornaram cepas de *Bacillus anthracis* mutantes mais sensíveis ao telurito, assim como a espécies reativas de oxigênio e à família de catelicidinas, antibióticos peptídicos. Constatou-se, também, que os mutantes apresentaram sobrevivência diminuída em sangue total humano e em camundongos. Consideram *C. elegans* um útil modelo de infecção para o estudo da patogenia do *Bacillus anthracis* (FRANKS *et al.*, 2014).

A correlação de dados microbiológicos e clínicos em cepas isoladas de hemoculturas, como o estudo da dinâmica dos biofilmes, da resistência ao K_2TeO_3, biocidas e a outros agentes oxidantes, assim como a disseminação de genes de resistência associadas aos marcadores de resistência aos antimicrobianos, pela disseminação de genes através de elementos genéticos como os IS26, junto a fatores predisponentes à ocorrência das IPCS (presença de cateter venoso, neutropenia, tempo de internação, *Lock* terapia) apresenta grande relevância e pode contribuir com medidas de controle, bem como na identificação e terapêutica destas infecções.

A detecção de agentes infecciosos específicos é tarefa de necessidade permanente e infindável, exigindo alta complexidade de recursos institucionais. A investigação epidemiológica, genética e da virulência desses microrganismos utilizando técnicas de Biologia Molecular associadas a ensaios para avaliação da virulência torna-se primordial no intuito de esclarecer e entender a dinâmica da possível transferência de genes de resistência associados a virulência na evolução da patogênese.

A triagem de cepas bacterianas através do K_2TeO_3 pode auxiliar na correlação destas características fenotípicas e genotípicas. O uso do telurito nos meios de cultura, tanto no isolamento como na identificação de algumas espécies

bacterianas, também tem seu importante papel na seleção de cepas com tolerância a este metalóide além de conferir a estas cepas resistência ao estresse oxidativo e consequente resistência fagocitária, que pode estar associada a genes que podem ser disseminados através de plasmídeos de multirresistência, contendo elementos móveis, que codificam resistência aos antimicrobianos, biocidas, agentes oxidantes e também fatores de virulência.

O estudo da formação de biofilme e determinação das concentrações inibitórias mínimas de agentes oxidantes e biocidas, também pode ser relevante para o entendimento da patogênes das IPCS frequentemente associadas/relacionadas ao uso de cateteres venosos. Portanto, torna-se importante o entendimento e associação destes mecanismos genéticos e de virulência, que poderão contribuir para o estabelecimento das estratégias, que através de protocolos específicos, possam contribuir para a prevenção, tratamento e das IPCSs em pacientes pediátricos.

1 **OBJETIVOS**

1.1 **Geral**

Avaliar relações entre o fenótipo de resistência ao Telurito de Potássio com os perfis de resistência aos antimicrobianos e com os fatores de virulência em bactérias de hemoculturas positivas de pacientes pediátricos hospitalizados.

1.2 **Específicos:**

a) descrever as características dos pacientes pediátricos quanto à presença de neutropenia e ao tipo de cateter;
b) avaliar a associação entre o uso de cateter em pacientes e a ocorrência de infecção primária de corrente sanguínea;
c) identificar espécies bacterianas por métodos fenotípicos e moleculares;
d) determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
e) verificar a capacidade de formação de *slime* nas amostras;
f) avaliar a capacidade de formação de biofilme em amostras de *Klebsiella pneumoniae*;
g) avaliar a resistência das amostras para diferentes concentrações de K_2TeO_3;
h) pesquisar genes de virulência nas amostras de *Escherichia coli*.

2 **MATERIAL E MÉTODOS**

2.1 **Delineamento do estudo e variáveis**

Trata-se de um estudo descritivo retrospectivo, com abordagem quantitativa dos dados, que analisou amostras bacterianas isoladas em hemoculturas de pacientes pediátricos hospitalizados no período de agosto de 2015 a agosto de 2016.

As amostras foram analisadas a partir das seguintes variáveis:

a) características relacionadas aos pacientes: unidade de internação, sexo, idade, diagnóstico, tipo de cateter (em casos com pacientes com cateter totalmente implantado, se fez ou não, *lockt*erapia antimicrobiana), neutropenia e classificação de infecção primária de corrente sanguínea associada a cateter e ao dano de barreira mucosa a partir dos critérios definidos pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017);

b) para o perfil microbiológico as variáveis identificadas foram: identificação dos microrganismos por espectrometria de massa e por metodologia automatizada, susceptibilidade aos antimicrobianos e ao K_2TeO_3, fatores de virulência a partir de técnicas fenotípicas para todas as amostras e de técnicas genotípicas para amostras de *E.coli*.

2.2 **Local do estudo**

O local do estudo foi o serviço de Pediatria de um Hospital Federal localizado no município do Rio de Janeiro. Este serviço é composto por 10 enfermarias de pediatria clínica e cirúrgica, cada enfermaria possui 2 leitos, 10 leitos de terapia intensiva pediátrica, e um ambulatório de hematologia pediátrica, onde são

realizadas consultas, coleta de exames laboratoriais e administração de quimioterápicos.

Esta pesquisa foi realizada em colaboração com o laboratório de Microbiologia do referido hospital associado ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DMIP-FCM-UERJ), local onde as amostras bacterianas foram analisadas.

2.3 **População do estudo e critérios de elegibilidade**

A amostragem se deu por conveniência, considerando as hemoculturas de todos os pacientes pediátricos no período de agosto de 2015 a agosto de 2016, conforme os seguintes critérios de elegibilidade:

a) critérios de Inclusão: os pacientes que apresentaram hemocultura positiva durante o período. Foi incluído uma amostra por paciente relacionado a infecção ou a colonização. Amostras bacterianas que apresentassem intervalo de datas de isolamento superior a 14 dias, de um mesmo paciente, também foram incluídas;
b) critérios de exclusão: pacientes que apresentassem hemocultura positiva, porém relacionadas à infecção secundária de corrente sanguínea, que seriam aqueles com hemocultura positiva com foco infeccioso identificável em outro sítio (pulmonar, urinário etc.).

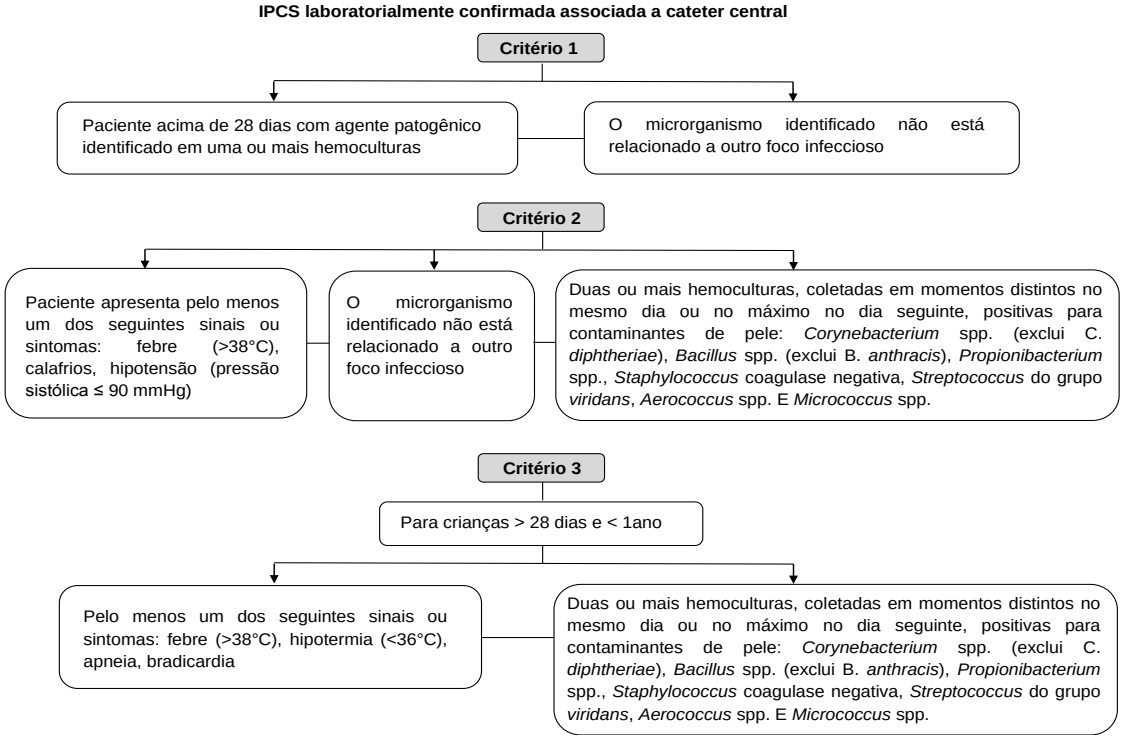
2.4 **Seleção das amostras**

2.4.1 Coleta de amostras bacterianas isoladas nas hemoculturas na rotina do laboratório de microbiologia da instituição hospitalar.

A rotina de avaliação dos pacientes com suspeita clínica de sepse (sinais clínicos como febre, taquicardia, hipotensão, oligúria, entre outros), infecção primária da corrente sanguínea e, também, aqueles que, na admissão ou durante a internação, estavam com neutropenia febril, inclui a solicitação de exames bacteriológicos pela equipe clínica do hospital em que o estudo foi realizado. Desta forma salienta-se que tanto a solicitação, assim como a coleta de sangue para as hemoculturas analisadas, acontecem como conduta clínica de rotina na unidade em apreço, independentemente do presente estudo.

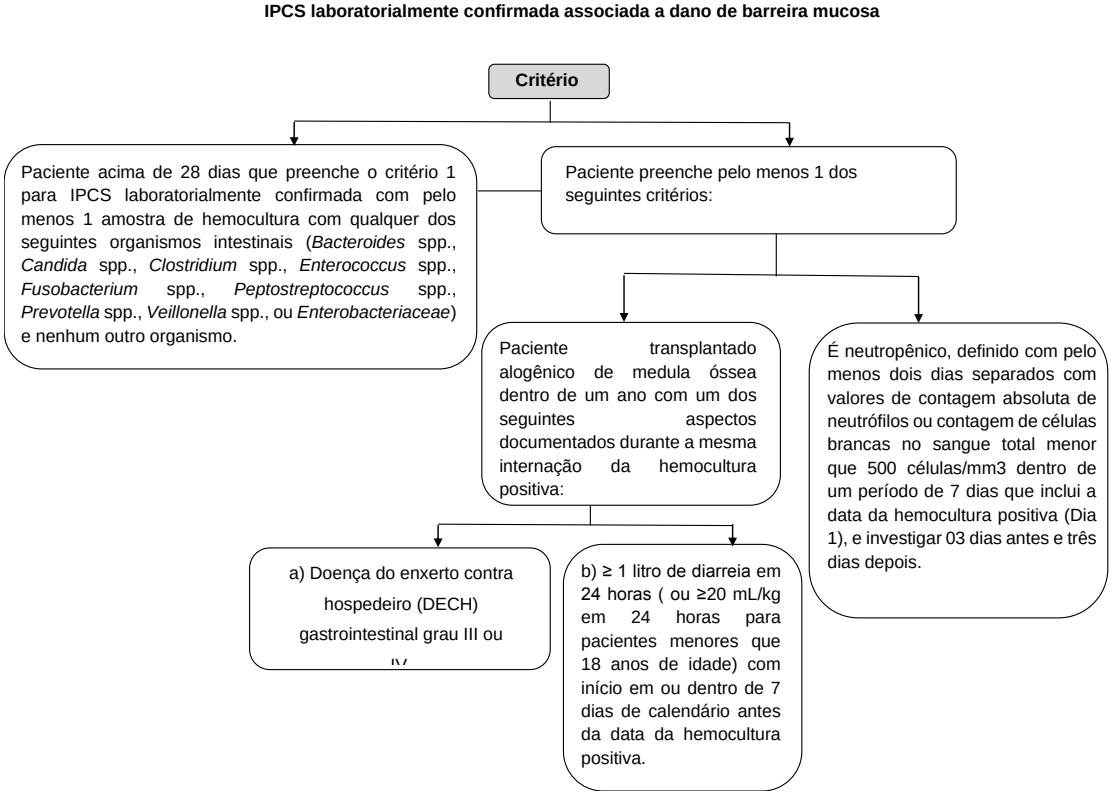
As amostras bacterianas foram encaminhadas e incluídas na Coleção de Bactérias do DMIP-UERJ. Os dados para cadastro destas amostras foram obtidos nas fichas de encaminhamento que incluem dados referentes às características dos pacientes, uso de antimicrobiano, uso de cateter venoso central, *lock* terapia nos cateteres totalmente implantados, neutropenia, sintoma abdominal, e a classificação de IPCS, a partir dos critérios definidos pela (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017), apresentados esquematicamente nas Figuras 1 e 2.

Figura1 - Sistematização dos critérios diagnósticos para infecção primária de corrente sanguínea, laboratorialmente confirmada como associada à cateter



Fonte: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017.

Figura 2 - Sistematização dos critérios diagnósticos para infecção primária decorrente sanguínea, laboratorialmente confirmada como associada a dano de barreira mucosa



Fonte: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017.

2.4.2 Acondicionamento das amostras bacterianas

Todas as amostras bacterianas foram estocadas em solução de leite desnatado a 10% (Skin Milk; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA), contendo glicerol a 10%, e mantidas a -20ºC, até a realização dos testes.

2.5 **Identificação bacteriana**

2.5.1 Identificação bacteriana no laboratório assistencial

As amostras tiveram sua identificação inicial realizada no laboratório assistencial com uso do sistema automatizado VITEK® 2 System com *software* versão 6.01 (bioMérieux, França). Para a identificação de amostras Gram positivas e Gram negativas, foram utilizados os cartões VITEK® 2 GP e GN (bioMérieux, França), respectivamente. A probabilidade da exatidão de identificação (nível de confiança) é dividida em quatro grupos: excelente (96 a 99%), muito bom (93 a 95%), bom (89 a 92%) e aceitável (85 a 88%).

2.5.2 Identificação bacteriana por espectrometria de massa

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPG-UFRJ).

Todas as amostras tiveram sua identificação confirmada por análise proteômica, utilizando a técnica de espectrometria por Ionização e Dessorção a Lazer Assistida por Matriz - Tempo de vôo (MALDI-TOF MS). Com o auxílio de um palito de madeira, uma pequena amostra da colônia isolada no meio Mueller Hintonagar (BD®, Heidelberg, Alemanha), foi transferida para um poço da placa 96 (Bruker Daltonik GMbH, Alemanha). A cada poço foi adicionada uma alíquota de 10 µL de matriz ácido alfa-ciano hidroxicinâmico (CHCA - Bruker Daltonik GMbH, Alemanha), e deixado secar em temperatura ambiente.

A placa foi então inserida no equipamento Microflex – MALD-TOF MS (Bruker Daltonik GMbH, Alemanha) para obtenção da identificação bacteriana. A amostra é exposta a pulsos de laser, ocorrendo a dessorção de moléculas ionizadas na fase gasosa. As moléculas são então aceleradas por potenciais elétricos num tubo de vôo até um espectrômetro de massa, com a separação de biomarcadores

determinados pela relação entre sua massa e carga elétrica. O espectro gerado é então comparado com outros presentes na biblioteca do programa flexControl 3.4 (Bruker Daltonik GMbH, Alemanha), gerando um escore de identificação, de acordo com o grau de similaridade.

Seguindo as recomendações do fabricante (Bruker Daltonik GMbH, Alemanha), as amostras cujo escore foi igual ou superior a 2,0 foram identificadas ao nível espécie, enquanto as amostras com escore inferior a 2,0 e superior a 1,7 foram identificadas até o nível gênero.

2.5.3 Identificação bacteriana por sequenciamento de fragmento de DNA

Para a identificação em espécie de um microrganismo exigente e raramente isolado na rotina da instituição hospitalar estuda foi empregado o sequenciamento do gene rDNA16S da bactéria.

2.5.3.1 Obtenção do DNA bacteriano

Para a obtenção do DNA bacteriano, foi utilizado o PureLink®Genomic DNA Mini Kit (K1820-01, Invitrogen, Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante.

2.5.3.2 Identificação bacteriana por sequenciamento do 16SrDNA

Para identificação por metodologia de sequenciamento do gene 16S rDNA foi realizada uma reação de amplificação, contendo uma mistura com: 2µL de DNA, obtido como descrito no item acima, 50ng de cada iniciador (27FB - 5'AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG 3' e 1492RAB - 5'GTT TAC CTT GTT ACG ACT T), 0,5 unidades

de Taq Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,1mM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 2mM de cloreto de magnésio e tampão na concentração final de 1X. A mistura da reação foi submetida a um ciclo inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto e 72°C por 2 min, seguidos de um ciclo adicional de 72°C por 15 minutos. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o *kit* QIAquick (Qiagen) e, em seguida, aproximadamente 100 ng foram usados para o sequenciamento.

O sequenciamento do produto de amplificação foi realizado em colaboração com a Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz – Genômica, Rio de Janeiro, usando-se o DYEnamic ET terminator kit (Amershambiosciences, São Paulo, Brasil) e as reações foram aplicadas no Sequenciador ABI 3730xL. As sequências foram confrontadas com sequências depositadas em bancos de dados (NCBI) para a identificação bacteriana.

2.6 **Teste de susceptibilidade**

2.6.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

As amostras tiveram seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos obtidos, também no laboratório assistencial, empregando-se o sistema automatizado VITEK® 2 System com o *software* versão 6.01(bioMérieux, França).

Para as amostras Gram positivas, utilizou-se o cartão VITEK® 2 AST-637 (bioMérieux, França). Os seguintes antimicrobianos foram analisados: ácido fusídico (AFS), ampicilina (AMP), benzilpenicilina (PEN), ciprofloxacina (CIP), clindaminica (CLIN), estreptomicina HLR (HLR-ST), eritromicina (ERI), gentamicina (GEN), gentamicina HLR (HLR-GE), linezolida (LIN), moxifloxacina (MOX), norfloxacina (NOR), oxacilina (OXA), rifampicina (RIF), teicoplanina (TEC), tigeciclina (TIG), trimetoprim-sulfametoxazol (SMX), vancomicina (VAN).

No caso de amostras Gram negativas, aplicou-se o cartão VITEK® 2 AST-239 (bioMérieux, França). Os seguintes antimicrobianos foram analisados: amicacina

(AMI), ampicilina (AMP), ampicilina-sulbactam (APS), cefepima (CPM), cefoxitina (CFO), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), cefuroxima (CRX), ciprofloxacio (CIP), ertapenem (ERT), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), meropenem (MER), piperacilina-tazobactam (PPT) e tigeciclina (TIG).

2.6.2 Teste de susceptibilidade ao Telurito de Potássio (K_2TeO_3) por diluição em ágar

A avaliação da susceptibilidade ao K_2TeO_3 foi realizada por meio de semeadura com auxílio de alça bacteriológica em meios de ágar chocolate (Laborclin, Paraná, Brasil) e ágar Mueller Hinton (BD®, Heidelberg, Alemanha) com concentrações de 25µg/mL e 112µg/mL de K2TeO3.

Após semeadura, as placas foram incubadas, em atmosfera de aerobiose**,** durante 24 horas a uma temperatura de 35-37ºC. As amostras que cresceram nos meios foram classificadas como resistentes ao K_2TeO_3, na respectiva concentração. Como controle positivo foi utilizada a cepa *K. pneumonia e* 401F10 e como controle negativo a *E. coli* K12, pertencentes a coleção de cultura da DIMI-FCM-UERJ.

2.6.3 Teste de susceptibilidade ao Telurito de Potássio (K_2TeO_3) por gradiente de concentração em ágar

A confecção das placas de Petri (150 x 20mm) com estimativas de concentrações decrescentes de K_2TeO_3, eram realizadas em duas etapas, o que permitia a formação de duas camadas sucessivas de ágar.

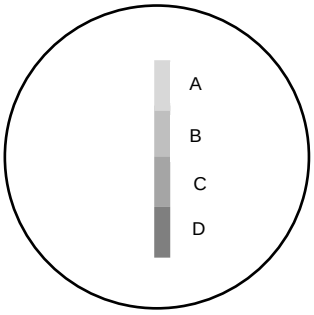
Inicialmente 10 mL de ágar Mueller Hinton (BD®, Heidelberg, Alemanha) foram distribuídos em placa e esta submetida a uma inclinação de 10º durante a solidificação do meio. Posteriormente, sob essa camada foi adicionado 10 mL de Mueller Hinton com K_2TeO_3 (BD®, Heidelberg, Alemanha). Este procedimento foi realizado para as concentrações de 25µg/mL, 112 µg/mL e 336 µg/mL. Assim uma

diluição proporcional à relação de espessura das camadas de ágar foi obtida, estabelecendo-se uma gradiente de concentração uniforme.

As amostras foram semeadas em 5mL de caldo infusão cérebro coração (BHI-Laborclin, Paraná, Brasil) e incubadas por 24 horas a 35-37°C. Após verificação do crescimento, foi realizada uma diluição 1:10 em solução salina 0,85%. Com auxílio de uma alça bacteriológica de 10µL, a suspensão foi semeada em estria única, de modo que alcançasse toda extensão do meio, perfazendo uma estria de aproximadamente 15cm. Essa placa foi incubada por 24h, a 35-37ºC, e foi observada a capacidade de inibição de crescimento da estria semeada no meio.

Para melhor avaliar a capacidade de cada amostra crescer sob diferentes gradientes de concentração, as estrias semeadas foram divididas em quatro faixas, denominadas A, B, C e D (Figura 3), de modo que a maior concentração fosse observada na faixa D e a menor a faixa A. Como controle positivo foi utilizada a cepa *K. pneumoniae* 401F10 e como controle negativo a *E. coli* K12, pertencente a coleção de cultura da DIMI-FCM-UERJ.

Figura 3 - Critérios interpretativos do teste de susceptibilidade ao telurito de potássio por gradiente de concentração em ágar



Fonte: A autora, 2021.

2.7 **Teste qualitativo para detecção de *slime* – Vermelho do Congo**

A partir de um crescimento recente em ágar MH, foi selecionada uma colônia de cada amostra bacteriana, e então semeada, de modo que se formasse pequenos círculos com massa bacteriana (*spots*), em meio de cultura Vermelho Congo (CRA; Sigmal Chemical Company, St Louis, MO, USA).

As placas foram incubadas durante 24 horas em atmosfera de aerobiose a uma temperatura de 35-37°C após o que foi realizada a primeira leitura. A segunda leitura foi realizada após 72 horas de incubação da placa em temperatura ambiente.

A caracterização da produção de *slime* foi baseada de acordo com o crescimento e coloração das colônias no meio, sendo positivas quando se observava a coloração negra, indeterminadas com a presença de coloração *bordeaux* e negativas com coloração translúcida.

Como controle positivo do teste foi utilizada a cepa *S. aureus* ATCC 25923 e como controle negativo a *E. coli* K12, pertencentes a coleção de cultura da DMIP-FCM-UERJ.

2.8 **Teste do fio**

Todas as amostras bacterianas identificadas como *K.pneumoniae* foram avaliadas quanto a capacidade de formação de fio em placa sob estímulo.

Após crescimento recente em meio MH ágar, todas as cepas foram tocadas com alça bacteriológica e esticadas perpendicularmente em relação à superfície do meio de crescimento para avaliar a presença, ou não, de fio.

O teste foi classificado como positivo quando se observava a presença de um fio viscoso maior que 5 mm (PATEL; RUSSO; KARCHMER, 2013). Como controle negativo foi utilizada a cepa *E. coli* K12, pertencente a coleção de cultura da DIMI-FCM-UERJ.

2.9 **Formação de biofilme**

As amostras bacterianas classificadas como *K. pneumoniae* foram cultivadas em agar MH, incubadas por 24h a 35-37°C. Posteriormente, 1 a 2 colônias foram semeadas em caldo tripticaseína de soja (TSB - Laborclin, Paraná, Brasil) e incubadas por 24h a 37°C sob agitação de 150 rpm. Após o período de crescimento

foi realizado um ajuste da cultura, em um novo tubo contendo caldo TSB, para uma suspensão com DO 0.1 a 580 nm.

Após o ajuste, 200 µL da suspensão padronizada em TSB foram distribuídas para cada poço de uma placa de microtitulação com fundo chato de 96 poços e incubados por 24h a 37ºC em aerobiose sem agitação. Ao término da incubação, os poços foram lavados 2X com tampão fosfato estéril (PBS; 0,01M; pH 7,2). Em seguida, 200 µL de cristal violeta 2% foram adicionados a cada poço. Após 5 minutos, os poços da placa foram lavados, exaustivamente, com PBS estéril. Após esta etapa, 150 µL de ácido acético a 33% foram adicionados aos poços para eluição do corante impregnado.

Foi utilizado como controle negativo o caldo TSB estéril. Então, a DO de cada poço foi aferida quanto à densidade ótica final (DOf), utilizando-se espectrofotômetro (Spectramax 190 Gemini ELISA, Molecular Devices Corp. Sunnyvalle, Calif) em comprimento de onda de 570 nm. As amostras foram então classificadas em três categorias com base na DO do controle negativo (DOC): não aderente (DOf ≤ DOC), fraca a moderadamente aderente (DOC <DOf ≤ 2 × DOC) e fortemente aderente (DOf> 2 × DOC) (STEPANOVIC, 2000).

2.10 **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

2.10.1 Detecção de genes codificantes de cápsula do grupo 2, alfa-hemolisina e fímbria S nas amostras de *Escherichia coli*

Para a pesquisa da presença dos genes *kps*MTII, *hly*A e *sfa*DE foi utilizada a técnica descrita por Johnson, Stell AL (2000), utilizando volume final de 25 µL e as seguintes concentrações de reagentes: 20 pmol de cada iniciador (Quadro 1); 20 mM de dNTP, tampão para PCR 1X, 1,5 mM de cloreto de magnésio; 2,5 unidades da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 2 µL de DNA bacteriano. A reação de termociclagem foi realizada no equipamento GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando

um ciclo de três minutos a 94°C, 25 ciclos alternados de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C e 30 segundos a 68°C, seguidos por um ciclo final de dez minutos a 72°C. Para validação da PCR utilizou-se uma reação sem DNA bacteriano (controle branco), e uma reação com DNA extraído de controle positivo de *E. coli* 143/09.

Quadro 1 - Genes alvos, iniciadores utilizados e fragmentos pesquisados na PCR para identificação do gene codificante de enterotoxinas nas amostras de *Escherichia coli.*

Iniciadores	Sequência 5'→3'	Alvo	Tamanho do fragmento (bp)
*kps*MTII(F)	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG	cápsula do grupo 2	272
*kps*MTII(R)	CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA		
*hly*A (F)	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T	alfa-hemolisina	1177
*hly*A(R)	ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A		
*sfa*DE(F)	CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	fímbria S	410
*sfa*DE(R)	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C		

Fonte: A autora, 2021.

2.10.2 Detecção de genes codificantes de fímbria P nas amostras de *Escherichia coli*

Para a pesquisa da presença do gene codificante da fímbria P, *pap*C, utilizou-se a técnica descrita por Le Bouguenec, Archambaud, Labigne (1992), com pequenas alterações na reação, utilizando volume final de 25 µL e as seguintes concentrações de reagentes: 20 pmol de cada iniciador (Quadro 2); 20 mM de dNTP, tampão para PCR 1X, 1,5 mM de cloreto de magnésio; 0,75 unidades da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 2 µL de DNA bacteriano. A reação de termociclagem foi realizada no equipamento GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando um ciclo de três minutos a 94 °C, 35 ciclos alternados de um minuto a 94°C, 30 segundos a 63°C e 3 minutos a 72°C, seguidos por um ciclo final de sete minutos a 72°C. Para

validação da PCR foi utilizada uma reação sem DNA bacteriano (controle branco), e uma reação com DNA extraído de controle positivo de *E.coli* 143/09.

Quadro 2 - Genes alvos, iniciadores utilizados e fragmentos pesquisados na PCR para identificação do gene codificante da fímbria P nas amostras de *Escherichia coli*

Iniciadores	Sequência 5'→3'	Alvo	Tamanho do fragmento (bp)
papC (F)	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G	fímbria P	328 bp
papC (R)	ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A		

Fonte: A autora, 2021.

2.10.3 Detecção de genes codificantes do sistema aerobactina de aquisição def erro nas amostras de *Escherichia coli*

Para a pesquisa da presença do gene codificante do sistema aerobactina, *iuc*D seguiu-se o protocolo estabelecido por Herrero; Lorenzo, Neilands (1988). Cada reação foi realizada com um volume final de 25 µL, contendo: 20 pmol de cada iniciador (Quadro 3); 20 mM de dNTP; tampão para PCR 1X; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,75 U da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 2 µL de DNA bacteriano. A amplificação foi realizada em um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700/ Applied Biosystems, Foster City, USA) sob as seguintes condições: um ciclo inicial de dois minutos a 94°C; 25 ciclos alternados de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, e um ciclo final de dez minutos a 72°C. Para validação da PCR foi utilizada uma reação sem DNA bacteriano (controle branco), e uma reação com DNA extraído de controle positivo de *E. coli* 143/09.

Quadro 3 - Genes alvos, iniciadores utilizados e fragmentos pesquisados na PCR para identificação do gene codificante do sistema aerobactina de aquisição de ferro nas amostras de *Escherichia coli*

Iniciadores	Sequência 5'→3'	Alvo	Tamanho do fragmento (bp)
*iuc*D(R)	AAG TGT CGA TTT TAT TGG TGT A	Aerobactina sideróforo	760 bp
*iuc*D(F)	CCA TCC GAT GTC AGT TTT CTG		

Fonte: A autora, 2021.

2.10.4 Detecção de genes codificantes da enzima malato dehidrogenase, intimina, invasina, plasmídeo enteroagregativo, toxina Shiga like 1 e 2, enterotoxina termolábil e termoestável nas amostras de *Escherichia coli*

Foi realizada a técnica de PCR multiplex descrita por Omar e Barnard (2014) com algumas alterações, para pesquisa de 8 genes alvos (Quadro 4).

As reações foram realizadas em volumes finais de 20 µL, contendo: tampão para PCR 1X; 20 pmol de cada par de iniciadores (Quadro 4); 20 mM de dNTP, 1,5mM de cloreto de magnésio, 2 unidades da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 3 µL de DNA bacteriano da amostra em análise.

A reação de termociclagem foi realizada no equipamento GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando um ciclo de três minutos a 94°C, 35 ciclos alternados de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e dois minutos a 68ºC, seguidos por um ciclo final de cinco minutos a 72°C. Para validação da PCR foi utilizada uma reação sem DNA bacteriano (controle branco), e duas reações com DNA obtidos de controles positivos EDL933 (*stx*1,*stx*2 *eae*A), 2348/69 (*eae*A), H10407 (*stelt*), 042 (*eagg*) e 20851 (*ial*), que foram extraídos separadamente e mantidos em um mix de controle positivo (*Pool*).

Quadro 4 – Genes alvos, iniciadores utilizados e fragmentos pesquisados na PCR para identificação do gene codificante da enzima malato desidrogenase, intimina, invasina, plasmídeo enteroagregativo, toxinas Shiga-like 1 e 2, enterotoxinas termolábel e termoestável nas amostras de *Escherichia coli.*(continua)

Iniciadores	Sequência 5'→3'	Alvo	Tamanho do fragmento (bp)
mdh (R)	GGC AGA ATG GTA ACA CCA GAG T	enzima malato dehidrogenase	304 bp
mdh (F)	GGT ATG GAT CGT TCC GAC CT		
*eae*A(R)	CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA	intimina	917 bp
eagg(F)	GAC GAT ACG ATC CAG		
ial(F)	GGT ATG ATGATGATG AGT GGC	invasina	630 bp
ial(R)	GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC		
eagg(F)	AGA CTC TGG CGA AAG ACT GTA TC	plasmídeo enteroagregativo	194 bp
eagg(R)	ATG GCT GTC TGT AAT AGA TGA GAA C		
stx1 (F)	ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG	toxina Shiga*like*1	614 bp
stx1(R)	CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG		
stx2 (F)	CCA TGA CAA CGG ACA GCA GTT	toxina Shiga*like 2*	779 bp
stx2 (R)	CCT GTC AAC TGA GCA CTT TG		
lt (F)	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	enterotoxina termolábil	450 bp
lt(R)	CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT		
st (F)	TTT CCC CTC TTT TAG TCA GTC ACC	enterotoxina termoestável	160 bp
st (R)	GGC AGG ATT ACA ACA AAG TTC ACA		

Fonte: A autora, 2021.

2.10.5 Análise dos produtos das PCR

Os produtos de amplificação das PCR (2,0 µL) foram misturados a 2,0 µL de corante (0,25% bromofenol / 20% glicerol) e, em seguida, aplicados em gel de agarose a 1,2% (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em 100 mL TBE 1X (Tris Base, ácido bórico, EDTA-0,5M e pH 8,0), corado com 10 µL de SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A eletroforese ocorreu em cuba horizontal (GibcoHorizon 58/ Biometra, Göttingen, Alemanha) com tampão TBE 1X com as seguintes condições: 100 V, 100 mA por 30 minutos. Os produtos amplificados foram observados em luz ultravioleta (UV) (DNr / Bioimaging systems - Mini Bis Pro/

BioAmerica) tendo por parâmetro o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

2.11 **Processamento e Análise dos dados**

Os dados foram analisados com uma abordagem quantitativa, à luz da estatística descritiva e tabulados com o uso do programa Microsoft Excel Office XP®.

Para as variáveis contínuas relacionadas ao paciente, como faixa etária, perfil de microrganismos e resistência foram realizadas medidas de frequência absoluta e relativa (porcentagem). Ainda quanto às características dos pacientes, foram avaliadas as seguintes associações: i) tipo de cateter versus presença de infecção primária de corrente sanguínea e ii*)* presença de neutropenia em relação ao gênero (sexo), unidade de internação, doença onco-hematológica e iii) hemocultura positiva. Para as associações foi avaliado significância estatística (p) pelo *qui*- quadrado (x^2) considerando o nível de significância de 0,05.

Quanto à análise do perfil microbiológico, foi medida a frequência absoluta das bactérias resistentes ao antimicrobiano, conforme o antibiograma. As amostras foram classificadas como multirresistentes a antimicrobianos quando apresentaram determinados fenótipos de resistência que são importantes para o ambiente hospitalar, como se segue: i) *Staphylococcus* sp resistentes a oxacilina, ii) Enterobactérias e Bastonetes Gram negativos não fermentadores resistentes a cefalosporinas de terceira/quarta geração e*/*ou a carbapenêmicos, iii) *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina.

2.12 **Procedimentos éticos**

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e foi aprovado com número do Parecer: 4.502.848. CAAE: 41955320.4.0000.5259. (ANEXO)

3 **RESULTADOS**

3.1 **Pacientes**

Durante o estudo (agosto de 2015 a agosto de 2016), foram selecionados 50 pacientes, destes, 43 se enquadravam nos critérios de inclusão estabelecidos pelo estudo. Sete pacientes foram excluídos, um por estar fora da faixa etária, um pelo isolamento de fungo na hemocultura, dois pelo espécime clínico ser diferente de sangue e três por apresentar infecção secundária da corrente sanguínea. Do total de pacientes, 25/43 (58,1%) tinham doença onco-hematológica, 20/43 (46,5%) estavam neutropênicos e 23/43 (53,5%) não neutropênicos, no momento da coleta. A maior parte dos pacientes era da faixa etária de lactentes, seguida de crianças nas faixas de pré-escolar e escolar, com percentuais de 32,5%, 25,6% e 23,3%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 **-** Distribuição dos pacientes pediátricos com hemocultura positiva de acordo com faixa etária e presença de neutropenia (n=20)

Faixa etária	Presença de neutropenia					
	Com neutropenia		Sem neutropenia		Total	
	n	%	n	%	n	%
0 a 28 dias (neonatal)	0	0	2	4,6	2	4,6
>28 dias - 2 anos (lactente)	3	6,9	11	25,6	14	32,5
3 - 6 anos (pré-escolar)	7	16,2	4	9,30	11	25,6
7 - 11 anos (escolar)	7	16,2	3	6,9	10	23,3
12 - 18 anos (adolescente)	3	6,9	3	6,9	6	13,9
Total	20	46,5	23	53,5	43	100%

Fonte: A autora, 2021.

A Tabela 2 apresenta a associação das variáveis relacionadas ao sexo, unidade de internação, presença**,** ou não, de doença onco-hematológica e hemocultura positiva com a presença ou ausência de neutropenia, foi evidenciado

significância estatística (p<0,001), apenas em relação à doença onco-hematológica, considerando que nestes pacientes a neutropenia é mais frequente.

Tabela 2 – Associação de características relacionadas aos pacientes pediátricos com hemocultura positiva quanto a presença de neutropenia

Características	Presença de neutropenia						p*
	Com neutropenia		Sem neutropenia		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Sexo							
Masculino	14	32,5	14	32,5	28	65,1	0,531
Feminino	6	13,9	9	20,9	15	34,9	
Unidade de Internação							
CTI	5	11,6	11	25,6	16	37,2	0,122
Enfermaria	15	34,9	12	27,9	27	62,8	
Doença onco-hematológica							
Sim	20	46,5	5	11,6	25	58,1	<0,001
Não	0	0	18	41,9	18	41,9	
Hemocultura Positiva							
IPCS	14	32,5	15	34,9	29	67,4	0,739
Colonização	6	13,9	8	18,6	14	32,5	

Legenda: * Qui-Quadrado considerando nível de significância de 0,05
Fonte: A autora, 2021.

Quando associado os tipos de cateter central, classificados em curta permanência (cateteres periféricos e cateteres centrais, que em pacientes pediátricos (cateteres periféricos) não possuem rotina de troca, ambos devem ser avaliados continuamente para necessidade da retirada, monitorização hemodinâmica etc.) e longa permanência (são cateteres tunelizados que podem permanecer implantados por meses e até anos, ou seja, acesso seguro em terapias de longa duração, como doenças onco-hematológicas entre outras), com a presença de IPCS, conforme demonstrado na Tabela 3, observou-se que apesar de não apresentar significância estatística, os pacientes portadores de cateteres de curta permanência apresentaram 1,13 mais chance de ocorrência de IPCS do que os cateteres de longa permanência (Tabela 3).

Tabela 3 - Associação dos tipos de cateter inserido nos pacientes pediátricos com hemocultura positiva quanto à presença de infecção primária da corrente sanguínea

Tipos de Cateter	Presença de IPCS						Odds Ratio	p**
	IPCS*		Sem IPCS*		Total			
	n	%	n	%	n	%		
Curta Permanência	19	44,2	7	16,3	26	60,5	1,13	0,859
Longa Permanência	12	27,9	5	11,6	17	39,5		
Total	31	72,1	12	27,9	43	100		

Legenda: *Infecção primária da corrente sanguínea (IPCS);**Qui-Quadrado considerando nível de significância de 0,05.
Fonte: A autora, 2021.

3.2 **Amostras bacterianas**

3.2.1 Identificação das amostras bacterianas

Foram incluídas no estudo, 59 amostras bacterianas isoladas de hemocultura de 43 pacientes pediátricos, independentemente de estarem ou não relacionadas a infecção. As espécies mais frequentes identificadas pelo sistema MALDI-TOF MS, foram SCN (19/44,2%), *K. pneumoniae* (11/25,6%) e *E. coli* (8/18,6%).

A maior parte das espécies bacterianas foram provenientes de episódios de IPCS, exceto para as espécies de SCN, onde quase a totalidade estava envolvida em casos de não-IPCS, independentemente de serem isoladas de pacientes com ou sem neutropenia. Somente um episódio de IPCS foi causado por SCN em paciente com neutropenia (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição das espécies bacterianas recuperadas de hemoculturas de recuperadas de pacientes pediátricos

Microrganismos	Pacientes (n=43)				Total n
	Com neutropenia (n=20)		Sem neutropenia (n=23)		
	IPCS*	Sem IPCS*	IPCS*	Sem IPCS*	
Acinetobacter baumanii			1		1
Brevibacterium celere		1			1
Chronobacter sakazakii			1		1
Campylobacter jejuni			1		1
Enterococcus faecalis			1		1
Enterobacter cloacae	2		2		4
E. coli	7		1		8
K. pneumoniae	9		2		11
P. aeruginosa	2				2
Pantoea sp			1		1
SCN**	1	10		8	19
S. aureus			5		5
Sphingomonas paucimobilis				2	2
Stenotrophomonas maltophilia	1				1
Streptococcus sanguini				1	1

Legenda: *Infecção primária da corrente sanguínea (IPCS); ** *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN).
Fonte: A autora, 2021.

3.2.2 Identificação bacteriana

Aproximadamente três quartos das amostras bacterianas (47/59) apresentaram concordância na identificação entre o VITEK® 2 System, realizado no laboratório de origem, e o MALDI-TOF MS aplicado como instrumento de confirmação dos dados. Nos 12 casos de discordância na identificação, sete apresentaram *score* acima de 2, caracterizando certeza na identificação em espécie, e cinco delas apresentaram *scores* entre 1,7 e 1,99, relacionado a nível de confiança em gênero (Tabela 5).

Tabela 5 – Relação das amostras bacterianas em que houve discrepância entre as metodologias aplicadas na identificação

	Métodos aplicados na identificação bacteriana		
Amostra	VITEK® 2 System	MALDI-TOF MS (*score*)	Sequenciamento do gene 16S rDNA
7	*Stenotrophomonas maltophilia*	*Pseudomonas hibiscicola (2.137)*	-
8	*Sphingomonas paucimobilis*	*Brevibacterium celere (2.049)*	-
11	*Staphylococcus Hominis*	*Staphylococcus epidermidis (2.034)*	-
18	*Enterobacter Cloacae*	*Enterobacter kobei (1.998)*	-
22	*Cronobacter Sakazakii*	*Enterobacter cloacae (2.128)*	-
32	*Sphingomonas paucimobilis*	*Micrococcus luteus (2.006)*	-
36	*Staphylococcus Warneri*	*Staphylococcus haemolyticus (2.011)*	-
42	*Enterobacter Cloacae*	*Enterobacter hormaechei (1.801)*	-
52	*Enterobacter Cloacae*	*Enterobacter Asburiae (1.779)*	-
128	*Francisella Tularensis*	-	*Campilobacter jejuni*
60	*Klebsiella Pneumoniae*	*Klebsiella variicola (1.826)*	-
91	*Staphylococcus Hominis*	*Staphylococcus epidermidis (2.139)*	-
80	*Klebsiella Pneumoniae*	*Enterobacter aerogenes (1.763)*	-

Fonte: A autora, 2021.

A amostra 128 foi, inicialmente, identificada pelo VITEK® 2 System como *Francisella tularensis,* e, como parte do protocolo da unidade hospitalar, foi encaminhada para um laboratório de apoio para sequenciamento do gene 16S rDNA, sendo identificada como *Campylobacter jejuni.* Não foi possível recuperar essa amostra para identificação por espectrometria de massa.

3.3 **Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos**

Para 14 amostras não foi possível a realização de um perfil de resistência aos antimicrobianos, uma vez que em sete amostras não foi observada resistência a nenhum dos antimicrobianos testados (*K. pneumoniae* n = 5; *E. coli* n = 2). Para cinco amostras não existe padronização para realização de antibiograma (*Pantoea* sp n = 1, *S. maltophilia* n = 1, *S. sanguinis n = 1 e S. paucimobilis* n = 2) e para duas amostras ocorreu a perda da viabilidade do microrganismo (*C. jejuni e B. celere*).

Diferentes perfis de resistência foram observados nas amostras bacterianas. As maiores diversidades desses perfis entre as espécies foram observados para SCN (17 perfis), *K. pneumoniae* (4 perfis) e *E. coli* (3 perfis).

Entre os perfis de resistência de SCN, aproximadamente 1/3 exibia marcador para classificá-los como multirresistentes (resistência a OXA). Todas os perfis destacados em *K. pneumoniae* foram multirresistentes (todos com resitência a CPM e apenas um com resistência a IMP). Para *E. coli* um único perfil foi classificado como multirresistente (resistência a CPM) (Tabela 6).

Tabela 6 – Perfil de resistência aos antimicrobianos entre as espécies bacterianas recuperadas de hemoculturas recuperadas de pacientes pediátricos

Microrganismos	Perfil de resistência aos antimicrobianos	n
A. baumanii	AMP-CFO-CRX	1
C. sakazakii	AMP-CFO-CRX	1
E. faecalis	CLIN-HLR-G	1
E. cloacae	AMP-APS-CPM-CFO-CAZ-CRO-CRX-IMP-PPT*	2
	AMP-APS-CPM-CFO-CAZ-CRO-CRX*	1
	AMP-APS-CFO-CRX	1
E. coli	AMP-CPM-CAZ-CRO-CRX*	1
	AMP-APS-CRX-PPT	1
	AMP-APS	3
	AMP	1
K. pneumoniae	APS-CPM-CAZ-CRO-CRX-ERT-IMP-MER-PPT*	1
	TIG-APS-CPM-CFO-CAZ-CRO-CRX-PPT*	2
	CIP-GEN-TIG-APS-CPM-CAZ-CRO-CRX*	1
	APS-CPM-CAZ-CRO-CRX-PPT*	2
P. aeruginosa	APS-CFO-CRO-CRX	2
SCN**	PEN-CIP-CLIN-ERI-GEN-MOX-NOR-OXA-TEC-SUT*	1
	PEN-CIP-CLIN-ERI-GEN-MOX-NOR-OXA-SUT-AFS*	1
	PEN-CIP-CLIN-ERI-MOX-NOR-OXA-SUT-AFS*	1
	PEN-CIP-CLIN-ERI-GEN-MOX-NOR-OXA-SUT*	1
	PEN-CIP-CLIN-ERI-MOX-NOR-OXA-SUT-AFS*	1
	PEN-CIP-CLIN-ERI-MOX-NOR-OXA-SUT*	1
	PEN-CIP-ERI-MOX-NOR-OXA-RIF-SUT*	1
	PEN-ERI-OXA-SUT-AFS*	1
	PEN-OXA-SUT-AFS*	1
	PEN-CLIN-ERI-OXA*	1
	PEN-ERI-OXA-TEC*	2
	PEN-ERI-OXA*	1
	PEN-OXA*	2
	PEN-ERI	1
	PEN-SUT	1
	PEN-LIN	1
	PEN	1
S. aureus	PEN-CLIN-ERI-GEN	1
	PEN-ERI-OXA*	1
	PEN-OXA*	3

Legenda: *Perfil de resistência classificados como multirresistentes; **_Staphylococcus_ coagulase negativo (SCN). Ampicilina (AMP); Ácido fusídico (AFS); Ampicilina-Sulbactam (APS); Ceftazidima (CAZ); Cefoxitina (CFO); Clindamicina (CLIN); Cefepima (COM); Ciprofloxacino (CIP); Ceftriaxone (CRO); Cefuroxima (CRX); Eritromicina (ERI); Ertapenem (ERT); Linezolida (LIN); Imipenem (IMI); Meropenem (MER); Moxifloxacino (MOX); Norfloxacino (NOR); Oxacilina (OXA); Penicilina (PEN); Piperacilina-Tazobactam (PPT); Rifampicina (RIF); Sulfametoxazol-Trimetoprim (SUT); Teicoplanina (TEC); Tigeciclina (TIG).

Fonte: A autora, 2021.

Duas amostras de *E. coli* apresentaram crescimento em meio contendo K_2TeO_3 (25µg/mL e 112µg/mL), sendo apenas duas positiva no meio Vermelho do Congo. Apenas uma cepa de *K. pneumoniae* com perfil de resistência aos antimicrobianos apresentou crescimento em meios contendo K_2TeO_3 (25µg/mL e

112µg/mL), apresentando, também, crescimento no meio com gradiente de concentração ao K_2TeO_3 (Tabela 7).

Tabela 7 – Produção de *slime* e sensibilidade a K_2TeO_3 em amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*

Amostra	Microrganismos	VC	Meio com K_2TeO_3 (µg/mL)		Gradiente de concentração ao K_2TeO_3 (µg/mL)		
			25	112	25	112	336
79	*E. coli*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
19*	*E. coli*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
1	*E. coli*	Pos	R	R	nhc	nhc	nhc
3	*E. coli*	Pos	R	S	nhc	nhc	nhc
130	*E. coli*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
140	*E. coli*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
58	*E. coli*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
72	*E. coli*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
9*	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
10	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
14	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
112*	*K. pneumoniae*	Neg	R	S	D	A	nhc
113	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
42	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
59*	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
80*	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
60	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
62*	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc
73*	*K. pneumoniae*	Neg	S	S	nhc	nhc	nhc

Legenda: *Perfil de resistência classificados como multirresistentes; Vermelho do Congo (VC); positivo (pos); negativo (neg); indeterminado (ind); não houve crescimento bacteriano (nhc); faixas nas estrias de crescimento em meio com gradiente de concentração de K_2TeO_3. (A, B, C e D); Resistência (R); Sensível (S).

Fonte: A autora, 2021.

Quando avaliamos a capacidade das espécies de *Staphylococcus* crescerem em meio contendo K_2TeO_3, constatamos que todas apresentaram resistência a concentração de 25 µg/mL e apenas três amostras (*S. aureus*) foram capazes de crescer na concentração de 112 µg/mL. Foram observadas diferenças no crescimento no meio Vermelho do Congo entre as espécies de SCN e *S.aureus,* sendo todas as amostras dessa última espécie positivas, além disso, observou-se crescimento uniforme (por todo o gradiente) nos meios com gradiente de concentração (Tabela 8).

Tabela 8 - Produção de *slime* e sensibilidade a K_2TeO_3 em amostras de *Staphylocccus* sp.

Amostra	Microrganismos	VC**	Meio com K_2TeO_3 (µg/mL)		Gradiente de concentração ao K_2TeO_3 (µg/mL)		
			25	112	25	112	336
2*	SCN	Neg	R	S	nhc	nhc	nhc
38*	SCN	Neg	R	S	D	C	nhc
68*	SCN	Ind	R	S	D	D	B
11*	SCN	Ind	R	S	D	D	nhc
16*	SCN	Ind	R	S	D	C	A
20*	SCN	Ind	R	S	D	D	A
39*	SCN	Ind	R	S	D	D	B
40*	SCN	Ind	R	S	D	D	B
27*	SCN	Ind	R	S	D	C	A
25*	SCN	Ind	R	S	D	D	B
36*	SCN	Ind	R	S	D	C	nhc
37*	SCN	Ind	R	S	D	C	nhc
47*	SCN	Ind	R	S	D	C	A
50*	SCN	Ind	R	S	C	nhc	nhc
129*	SCN	Ind	R	S	D	C	A
70*	SCN	Ind	R	S	D	D	nhc
87*	SCN	Neg	R	S	D	D	A
84*	SCN	Ind	R	S	D	D	B
64*	SCN	Neg	R	S	D	D	B
28*	*S. aureus*	Pos	R	S	D	C	C
105	*S. aureus*	pos	R	S	D	D	B
65*	*S. aureus*	Pos	R	R	D	D	C
66*	*S. aureus*	Pos	R	R	C	C	C
67*	*S. aureus*	Pos	R	R	D	C	C

Legenda: *Perfil de resistência classificados como multirresistentes; *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN); positivo (pos); negativo (neg); indeterminado (ind); não houve crescimento bacteriano (nhc); faixas nas estrias de crescimento em meio com gradiente de concentração de K_2TeO_3. (A, B, C e D); Resistente (R); Sensível (S).

Fonte: A autora, 2021.

Todas as amostras de *K. pneumoniae* foram capazes de produzir de moderado (moderada quantidade de produção) a forte (elevada quantidade de produção) biofilme. Das cinco amostras positivas para o teste do fio, três delas apresentaram perfil de sensibilidade a todos os antimicrobianos. Uma amostra foi caracterizada como multirresistente por mais de um marcador de resistência (descritos acima, na Tabela 7) e cresceu no meio com gradiente de concentração de K_2TeO_3 (Tabela 9).

Tabela 9 – Comportamento das amostras de *K. pneumoniae* frente a formação de biofilme, ao teste do fio e a sensibilidade ao K_2TeO_3

Amostra	Formação de biofilme	Testedo fio	Gradiente de concentração ao K_2TeO_3 (µg/mL)		
			25	112	336
9*	++	pos	nhc	nhc	nhc
10	+++	pos	nhc	nhc	nhc
14	++	pos	nhc	nhc	nhc
112*	++	pos	D	A	nhc
113	++	pos	nhc	nhc	nhc
42	++	neg	nhc	nhc	nhc
59*	++	neg	nhc	nhc	nhc
80*	+++	neg	nhc	nhc	nhc
60*	++	neg	nhc	nhc	nhc
62*	++	neg	nhc	nhc	nhc
73	++	neg	nhc	nhc	nhc

Legenda: *Perfil de resistência classificados como multirresistentes; forte formador de biofilme (+++); moderado formador de biofilme (++); positivo (pos); negativo (neg); não houve crescimento bacteriano (nhc); faixas nas estrias de crescimento em meio com gradiente de concentração de K_2TeO_3 (A, B, C e D).

Fonte: A autora, 2021.

Entre as amostras de *E. coli* estudadas, quatro delas merecem destaque por albergarem genes de virulência relacionados a sideróforos e uma à produção de cápsula. Esta última, além de apresentar o marcador molecular para produção capsular, também foi capaz de produzir *slime* observado no meio Vermelho do Congo (Tabela 10).

Tabela 10 – Comportamento das amostras de *E.coli* frente a formação de *slime,* detecção de genes de virulência e a sensibilidade ao K_2TeO_3

Amostra	VC	Genes de virulência	Gradiente de concentração ao K_2TeO_3 (µg/mL)		
			25	112	336
79	neg	-	nhc	nhc	nhc
19*	neg	*iucD*	nhc	nhc	nhc
1	pos	*iucD*	nhc	nhc	nhc
3	pos	*kpsMTII*	nhc	nhc	nhc
130	neg	-	nhc	nhc	nhc
140	neg	-	nhc	nhc	nhc
58	neg	*iucD*	nhc	nhc	nhc
72	neg	*iucD*	nhc	nhc	nhc

Legenda: *Perfil de resistência classificados como multirresistentes; Vermelho do Congo (VC); negativo (neg); positivo (pos); não houve crescimento bacteriano (nhc); gene que codifica produção de sideróforo (IucD); gene que codifica produção de cápsula (kpsMTII).

Fonte: A autora, 2021.

4 **DISCUSSÃO**

Nossos resultados mostraram que, entre as características clínicas e demográficas dos pacientes pediátricos com hemocultura positiva quanto à presença de neutropenia, a única variável que apresentou diferença estatística foi a presença de doença onco-hematológica. Estudos mostram que, entre os pacientes com câncer, doenças hematológicas oferecem o maior risco para IPCS aos pacientes com tumores sólidos, assim como para os pacientes com doença hematológica maligna como leucemia e linfoma (GOWIN *et al.*, 2020).

A neutropenia é o maior fator de risco independente para IPCS e pacientes com esta infecção tem maior mortalidade em comparação a pacientes não neutropênicos. Vale ressaltar que os cateteres totalmente implantados são inseridos através de procedimento cirúrgico, reforçando a necessidade de atualizações e revisão de rotinas, vigilância, treinamentos e verificação de medidas preventivas, através de *bundles* de inserção e manutenção de CVCs (higienização das mãos, técnica asséptica etc.) (BÖLL *et al.*, 2021; GORSKI, 2017; PINELLI *et al.*, 2018; O'GRADY *et al.*, 2011).

Portanto, os cuidados com o cateter, além da condição do paciente (neutropenia), devem ser reforçados durante toda assistência. Este cuidado deve ser muito maior no manuseio do cateter, onde o risco de infecção é maior, ou seja, com as rotinas e medidas preventivas para as IPCSs relacionadas ao CVC**.** Os cuidados preventivos devem ser realizados independentemente do tipo de (cateter totalmente implantado e os de curta permanência) e, adicionalmente, devem ser acompanhados e revisados periodicamente

Infecções da corrente sanguínea associadas ao *Port* são classificadas com o mesmo critério das que são classificadas como relacionadas aos outros cateteres venosos centrais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). Embora seja o dispositivo de menor risco, comparado aos outros cateteres venosos, complicações frequentes são encontradas em alguns serviços de saúde. De acordo com o IDSA, assim como pela ANVISA, hemoculturas não devem ser coletadas rotineiramente de pacientes que não apresentam sintomas de IPCS. Em um estudo retrospectivo em instituição de tratamento de crianças com câncer, as principais

complicações com este tipo de cateter foram as mecânicas e as infecciosas (GOWIN *et al*., 2020, TÖLLER *et al*., 2019).

Nos pacientes avaliados no presente trabalho os cateteres de curta permanência estavam associados a uma chance 1,13 vezes maior de causar IPCS quando comparados aos cateteres de longa permanência, já que estes possuem um menor risco de causar infecção, mas um estudo transversal realizou uma retrospectiva de IPCS em pacientes onco-hematológicos com cateter venoso de longa permanência e mostrou que este dispositivo estava relacionado a 68% dos casos de IPCS (ÖZALP GERÇEKER *et al.*, 2019). De fato pacientes oncológicos em geral, fazem uso de cateteres venosos centrais de longa permanência frequentemente, para um tratamento quimioterápico seguro, assim são mais expostos aos riscos de infecção relacionados aos cuidados com o cateter, e assim se faz necessário cuidado rigoroso no manuseio e na infusão de medicamentos, isto mostra que na unidade do estudo, a vigilância e as medidas preventivas parecem ser eficazes e quando estas não são seguidas o risco de IPCS pode aumentar independente do tipo de cateter.

O Vitek® identificou uma amostra como *Francisella tularensis*. Por não se tratar de um microrganismo frequentemente relacionado ao ambiente hospitalar, seguindo os protocolos estabelecidos pelo hospital, esse microrganismo foi enviado para identificação por sequenciamento do gene 16S rDNA. É sabido que *F. tularensis* é uma bactéria transmitida por carrapatos, especialmente pelo gênero *Dermacentor* spp, tipicamente encontrado em cavalos, e é o agente etiológico de uma doença potencialmente fatal, conhecida como tularemia (REIF et al, 2018; KOH et al, 2019). Além disso, vale ressaltar que numerosos trabalhos apontam dificuldade na identificação de certos grupos de microrganismos por sistemas automatizados (CAO *et al.*, 2021; KOREM *et al.*, 2020; SHIN *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021).

Importante ressaltar que a amostra erroneamente identificada como *F. tularensis* pelo Vitek®, após (a identificação por) o sequenciamento do gene 16S rDNA, foi identificada como *Campylobacter jejuni*. Este microrganismo figura na lista de prioridade global de bactérias resistentes a antibióticos da Organização Mundial da Saúde (OMS), que visa orientar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novas drogas, como uma bactéria de alta prioridade (OMS, 2017). Desta forma, *C.*

jejuni é um agente de infecção para o qual é urgente a necessidade de novas alternativas de tratamento.

Espécies de *Campylobacter* são conhecidas por causar enterite e nos últimos 40-50 anos, este microrganismo esteve associado a infecções variadas, como celulite, espondilodiscite e bacteremia, sendo o *C. jejuni* a espécie mais implicada nos casos de bacteremia (PISIPATI *et al.*, 2020).Entretanto, há relatos de que doenças causadas por *Campylobacter jejuni* raramente estejam associadas a complicações extra-intestinais e que a bacteremia por *C. jejuni* é difícil de detectar em pacientes com neoplasias hematológicas submetidos à quimioterapia. Assim como o nosso trabalho, um estudo na Itália relatou dois casos de bacteremia em pacientes pediátricos afetados por leucemia linfoblástica aguda (MARTORA *et al.*, 2020). Entre as doenças associadas à infecção por *C. jejuni,* merece destaque a síndrome de Guillain-Barré, uma doença auto-imune do sistema nervoso periférico (KOIKE *et al.*, 2021).

A realização de identificação de espécies bacterianas em pacientes imunodeprimidos faz-se necessária para evitar o uso inadequado de antimicrobianos de amplo espectro e diminui o risco de realização de procedimentos mais invasivos que podem comprometer o prognóstico destes pacientes. Esta amostra bacteriana, por ser uma espécie exigente para cultivo não foi recuperada para posteriores análises, portanto não foi possível realizar o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Das 59 amostras bacterianas isoladas de hemocultura dos pacientes pediátricos, as espécies mais frequentes identificadas foram SCN (19/44,2%), *K. pneumoniae* (11/25,6%) e *E. coli* (8/18,6%). Özalp Gerçeker (*et al*., 2019) verificaram SCN em 47,6% dos pacientes onco-hematológicos, sendo a espécie mais freqüente nas infecções da corrente sanguínea. Outro estudo mostrou, em pacientes pediátricos neutropênicos que amostras de *E. coli* foram os microrganismos mais frequentemente observados (STEINBERG *et al.*, 2013).

De acordo com o último Boletim Informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar (RJ), de junho de 2021, SCN, *S. aureus*, Complexo *K. pneumoniae*, *Serratia* spp. e *P. aeruginosa* foram os microrganismos mais envolvidos em IPCS, em 2020. É importante ressaltar que estes dados são referentes as IPCS notificadas em unidades de terapia intensiva pediátrica, sem

discriminação de diagnóstico entre os pacientes pediátricos (pacientes clínicos, cirúrgicos e oncológicos). As espécies envolvidas nas IPCS de pacientes onco-hematológicos na maioria dos centros de atendimento para estes pacientes são comumente causadas por SCN, mas recentemente algumas instituições têm notificado também bactérias Gram negativas MDR (ALP, AKOVA, 2013). A predominância de enterobactérias, principalmente *K. pneumoniae* e *E.coli*, tem se tornado comum e isso deve-se a características específicas dos pacientes com câncer, como uso profilático de fluoquinolonas e hospitalização com uso de cateter intravascular, além da mucosite associada à quimioterapia (VÁZQUEZ-LÓPEZ *et al.*, 2019).

Entre as espécies bacterianas isoladas no presente estudo, a maioria era proveniente de episódios de IPCS. No entanto, as espécies de SCN não estavam, na maioria das vezes associadas a IPCS, com exceção de um caso de IPCS que foi causado por SCN em paciente com neutropenia. Bactérias Gram-positivas predominaram em hemoculturas de pacientes com diagnóstico de imunodeficiências e outras condições não oncológicas e não hematológicas (AMANCIO *et al.*, 2020). Entre as espécies encontradas, *Staphylococcus epidermidis* foi o principal agente identificado (77,7%), possivelmente devido à colonização da pele e consequentemente do cateter. No entanto, bactérias Gram-negativas com um perfil de resistência representaram 40% dos casos de infecções bacterianas, a principal espécie associada foi *K. pneumoniae* (66,6%). Esta bactéria se mostrou responsável por um risco maior de admissão em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica e morte (AMANCIO *et al.*, 2020).

A prevalência de enterobactérias MDR encontradas neste estudo não foi relevante. Entre os perfis de resistência observados entre os *Staphylococcus* sp, o perfil fenotípico de multirresistência (resistência a OXA – MRSA e MRSE) foi observado na quase totalidade das amostras. É sabido que, em casos graves causados por *Staphylococcus* sp resistentes a oxacilina, a opção terapêutica mais comumente adotada é a vancomicina. No entanto, recentemente, foi relatado o caso de um paciente, em nosso país, com uma infecção da corrente sanguínea causada por uma amostra resistente a vancomicina. O número crescente de infecções relatadas causadas por *Staphylococcus* sp resistente no Brasil torna necessário estudos de vigilância para ajudar a entender como essas cepas circulam em

ambientes de saúde (ANDRADE *et al.*, 2020; ROSSI *et al.*, 2014; ZUMA *et al.*, 2017).

Estas complicações infecciosas em algumas situações indicam a remoção do dispositivo (GOWIN *et al.*, 2020). Estudos têm mostrado que SCN foi associado à infecções relacionadas aos cateteres intravascular e doença neoplásica, enquanto *S. aureus* com doenças crônicas como as renais e diabetes mellitus (N'GUYEN *et al.*, 2012).

Infecções da corrente sanguínea em pacientes neutropênicos têm como principal agente os SCNs e estes têm grande facilidade em adquirir genes de resistência aos antimicrobianos no ambiente hospitalar, que dificulta o tratamento do paciente. Das 19 cepas de SCN, 13 cepas apresentaram um fenótipo de MRSE, ou seja, resistência a oxacilina e a outros antimicrobianos. Este fenótipo de resistência, em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* isolados no ambiente hospitalar, é comum, sendo a porcentagem de resistência à oxacilina em torno de 80%. Ainda é discutida a função destas espécies como reservatórios de genes de resistência, portanto, análises e investigações devem ser realizadas para nortear medidas de higiene, vigilância e de prevenção no ambiente hospitalar (HEILMANN *et al.*, 2017).

Aproximadamente, metade das amostras de *K. pneumoniae,* e uma única amostra de *E. coli*, apresentaram resistência a CPM, uma cefalosporina de "quarta geração" que é frequentemente usada como terapia nas infecções associadas aos cuidados de saúde (CHOPRA *et al.*, 2012; MUKHERJEE *et al.*, 2021). A resistência a esse antimicrobiano está relacionada, principalmente, à produção de enzimas do tipo ESBL, que são os genes mais comumente associados, em todo o mundo, incluindo o Brasil, *bla*CTX-M e *bla*SHV (AABED *et al.*, 2021; EDA *et al.*, 2020; OLOWO-OKERE *et al.*, 2018). Uma limitação do nosso estudo foi não ter buscado os mecanismos genéticos associados a essa resistência.

A detecção de genes de resistência, principalmente nas enterobactérias, é uma importante ferramenta epidemiológica. A colonização intestinal por bactérias portadoras de genes de resistência pode favorecer a disseminação destes genes, que é facilitada devido a grande plasticidade genética das enterobactérias, em especial *E. coli*, e o intestino é um dos ambientes favoráveis para estas trocas de material genético entre as espécies. Estudos mostram que *E. coli* carrea vários genes de resistência aos betalactâmicos, aos aminoglicosídeos e ao trimetoprim,

sendo os genes respectivamente mais prevalentes para cada classe destes antimicrobianos *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$, *aph(6)-Id* e *aadA5* e *dfrA* (PARAMITA *et al.*, 2020).

A maior parte das cepas de enterobactérias isoladas não apresentou fenótipo de multirresistência, mas podem ter um importante papel como portadoras de genes de resistência que podem ser transferíveis e, além do mais, genes de virulência, importantes para sua sobrevivência e invasão. Uma revisão sistemática indica que as ExPECs possuem um importante papel na disseminação global de genes de resistência, sendo o fenótipo de ESBL o mais predominante, mas ExPEC suscetíveis aos antimicrobianos são causadoras de infecções extraintestinais também tem sua importância (MANGES *et al.*, 2019).

Uma das primeiras etapas para manutenção das cepas bacterianas nos ambientes, superfícies, dispositivos e tecidos é a adesão. É discutido que na maioria das situações as infecções são precedidas de colonização bacteriana, algumas espécies bacterianas colonizam e fazem parte da nossa microbiota normal. Estes microrganismos podem albergar genes envolvidos com fatores de virulência e são capazes de se aderir em dispositivos, superfícies e tecidos do hospedeiro. Inicialmente os estudos na década de 80 começaram a visualizar uma matriz (*slime*) formada naturalmente por *Staphylococci* em cateteres intravenosos e atualmente são denominados biofilmes que conferem proteção às bactérias frente aos mecanismos de defesa do organismo e à ação de desinfetantes, antissépticos e antimicrobianos (HEILMANN *et al.*, 2017). Outras espécies bacterianas também tem a capacidade de produzir biofilme. A formação de biofilme pode ser avaliada por diferentes metodologias, sendo uma delas o meio Vermelho do Congo.

As amostras de *S. aureus* que já tem seus mecanismos de virulência reconhecidos e descritos como cepas causadoras de infecções graves são classicamente produtoras de slime e biofilmes mais robustos, todas as cepas foram positivas no vermelho do Congo, diferente dos SCN. A avaliação da produção de *slime* foi avaliada em todas as cepas isoladas neste estudo através da utilização do meio Vermelho do Congo. No ambiente hospitalar, os SCN apresentam uma perda de sensibilidade ou se apresentam, frequentemente resistentes aos antimicrobianos e essa resistência se associa à produção de *slime,* que é importante fator de virulência para colonização (BERNARDI *et al.*, 2007).

Entre as enterobactérias, as amostras de *E. coli* apresentaram resultado positivo no meio Vermelho do Congo (duas amostras), as mesmas que continham o gene *kpsMTII* responsável pela produção de cápsula e gene *iucD*, responsável pela produção de sideróforo. As *K. pneumoniae* foram todas negativas para produção de *slime,* mas foram todas produtoras de biofilme detectado através de metodologia quantitativa. Vimos que a produção de *slime* é mais generalizada no gênero *Staphylococcus* e para *K. pneumoniae* a produção de *slime* não foi concomitante com a produção de biofilme quantitativo.

A identificação de bactérias produtoras destes fatores de virulência é importante para a indicação da patogenicidade do microrganismo e, assim, contribui para a implementação de medidas e estratégias de controle e prevenção, principalmente medidas de prevenção de IPCS, onde o biofilme é envolvido na patogênese destas infecções relacionadas aos CVCs

Os resultados obtidos mostraram que todas as amostras de *K. pneumonaie* foram capazes de produzir biofilme. Cinco amostras merecem destaque por terem apresentado resultado positivo para o teste do fio, sendo que três destas amostras foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Estes achados sugerem se tratar de cepas de *K. pneumoniae* hipervirulentas, responsáveis por infecções graves adquiridas na comunidade, podendo ser prevalentes em infecções invasivas como as bacteremias (SHANKAR *et al.*, 2018). Uma característica importante destas cepas hipervirulentas é a possível presença de um grande plasmídeo de virulência que alberga genes de resistência ao telurito de potássio, tais como *ter*ZABCDE e *ter*W, este último parece apresentar uma maior relação com as cepas hipervirulentas (PASSET; BRISSE, 2015).

A adesão de microrganismos na superfície interna do cateter favorece a formação do biofilme e permite a liberação de bactéria dentro da corrente sanguínea, podendo levar a bacteremias e subsequente IPCS. A colonização bacteriana de qualquer tipo de cateter é inevitável, a evolução para infecção é um fenômeno relativamente raro, está relacionado com a virulência e a quantidade do microrganismo dentro do biofilme, que por si só pode aumentar a patogenicidade dos microrganismos. O uso de soluções antimicrobianas em *Lock* terapia apresentam CIM de 100 a 1000 vezes maior que a CIM comumente utilizada na terapia convencional e pode ser capaz de destruir o biofilme (PINELLI *et al.*, 2018).

O uso destas soluções antimicrobianas na *Lock* terapia necessita ser empregadas em conjunto com soluções anticoagulantes, para manter a permeabilidade do cateter, principalmente nos cirurgicamente implantados. Existem contraindicações para a utilização da heparina.

Uma das contra indicações do uso de heparina com etanol, é o mau funcionamento dos cateteres, e limitações devido a eventos adversos, como altas concentrações do etanol e precipitação de proteínas que podem comprometer a viabilidade do cateter, além do mais a heparina tem mostrado aumentar a formação de biofilme por *Staphylococcus* sp., favorecendo a incidência de IPCS por este genêro (ALONSO *et al.*, 2019, CHAFTARI *et al.*, 2017).

Novas soluções anticoagulantes estão sendo estudadas, como nitroglicerina, que mostrou ter ação superior a tauloridina, e tem sido útil em pacientes com câncer que necessitam utilizar CVC por longos períodos. Uma das suas vantagens é não estar combinada aos antimicrobianos, e, assim, induzir menos resistência microbiana (CHAFTARI *et al.*, 2017).

Amostras de enterobactérias isoladas das hemoculturas de pacientes neutropênicos e com doença onco hematológica foram analisadas, as espécies mais prevalentes deste grupo foram *K. pneumoniae e E. coli*, que compõem a microbiota intestinal. Amostras de *Klebsiella spp.* foram mais prevalentes, podendo este achado ser justificado pela modificação da microbiota destes pacientes devido aos múltiplos atendimentos e internações no ambiente hospitalar devido à sua condição de saúde.

A avaliação de bacteremia em pacientes com câncer deve ser considerada e classificada como IPCS, de acordo com o novo critério (quebra de barreira e mucosa) recomendado pelos critérios nacionais de classificação de IRAS (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). Portanto esta definição pretende identificar bacteremias neste grupo de pacientes, relacionado com a quebra da barreira mucosa, favorecendo a translocação de bactérias do trato gastrointestinal que não estão diretamente relacionadas a infecção do CVC (BÖLL *et al.*, 2021).

Apenas uma cepa de *K. pneumoniae* e duas cepas *E. coli* apresentaram crescimento nos meios contendo K_2TeO_3, nas concentrações de 25 e 112µg/mL. Podemos considerar que as concentrações utilizadas foram elevadas ao comparar com estudos que utilizam meios contendo K_2TeO_3 para avaliação da virulência. A presença do determinante de resistência ao K_2TeO_3, tão amplamente detectada

entre muito diversos táxons bacterianos, parece corroborar a hipótese de que, em geral, tal determinante pode estar associado a vantagem seletiva (Valková *et al.*, 2007), dentro de constatação (ainda restrita a alguns determinados gêneros e espécies bacterianas) de efeito protetor diante de mecanismos celulares microbicidas. As evidências incluem Gram positivas (*Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Yersinia pestis* e *Bacillus anthracis*) (ORTH *et al.*, 2006; CHASTEEN *et al.*, 2009; PEI *et al.*, 2013; FRANKS *et al.*, 2014; SANTOS, 2015) e em Gram negativas como *E.coli, E. coli* produtora de toxina Shiga*, Vibrio cholerae*, *K. pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae* hipervirulentas (CHASTEEN *et al.*, 2009; PATEL; RUSSO; KARCHMER, 2013; PEI *et al.*, 2013).

É importante destacar que os resultados das semeaduras das amostras de *Staphylococcus* sp foram diferentes das amostras de enterobactérias, observou-se crescimento de todas amostras deste gênero nos meios com K_2TeO_3 nas concentrações de 25 e 112µg/mL.

Foi observado nas amostras bacterianas de SCN um perfil de resistência variado em relação a cor e morfologia da colônia, tanto na semeadura nos meios com K_2TeO_3 nas concentrações de 25 e 112µg/mL, quanto no teste de susceptibilidade ao K_2TeO_3 por gradiente de concentração em ágar (SZYBALSKI; BRISON, 1952), de forma diferente que nas amostras de Enterobactérias e *S. aureus*, onde o crescimento nestes meios foi homogêneo, assim como na cor morfologia das colônias destas espécies.

Estas diferenças talvez podem ser explicadas pelo fato de algumas enzimas como a catalase ter uma função também em realizar a detoxificação do K_2TeO_3, como por exemplo, as catalases produzidas *S.epidermidis*, espécie de SCN com maior frequência de isolamento neste trabalho também, envolvida nesta função e, assim como estas catalases, outras enzimas, em algumas espécies bacterianas, são conhecidas por conferir um baixo nível de resistência ao K_2TeO_3 (VÁVROVÁ *et al.*, 2021).

Estudos consideram os SCNs como reservatório de genes de resistência e virulência um assunto bem discutido na literatura. A contribuição prática do entendimento e estudos destes rearranjos genéticos que o SCN é capaz pode auxiliar em medidas preventivas para cepas de SCN virulentas e resistentes para

orientar melhor no futuro as ações de controle de infecção (HEILMANN *et al.*, 2019). Talvez a variabilidade da sensibilidade dos SCN ao K_2TeO_3 possa orientar hipóteses e definir caminhos para melhor entendimento da dinâmica genética e das relações entre colonização e infecção causadas pelos SCN.

Interessa identificar os genes associados à resistência ao K_2TeO_3 por iniciadores, já disponíveis, para reações de PCR. Também, pretendemos (futuramente) investigar a disseminação de genes específicos de resistência ao K_2TeO_3, já, bem caracterizados, entre diferentes espécies e gêneros, em particular, entre bastonetes Gram negativos. É interessante que, no nosso estudo, a resistência ao K_2TeO_3 apareceu de forma homogênea para os *S. aureus* e pudemos constatar esta propriedade para as mais altas concentrações avaliadas. Isso está de acordo com o fundamento da utilização de meios de cultura seletivos para *S. aureus*. Sugerimos que, nos *S. aureus*, a resistência ao K_2TeO_3 deve estar adicionada (ou em sinergia) com os vários outros fatores de virulência já descritos para a espécie. Também, dentro dessa hipótese, pretendemos, posteriormente, investigar propriedades de resistência ao estresse oxidativo nas cepas de SCN resistentes ao K_2TeO_3 como possível fator de virulência relevante.

O uso de meios de cultura contendo o K_2TeO_3 podem contribuir na seleção de cepas que colonizam o trato gastrointestinal e que, possivelmente, são relacionadas a infecção e, desta forma, pode ser útil para melhor entender as relações entre os tipos de *operons* relacionados a características fenotípicas e ecológicas de cepas que colonizam pacientes particularmente, nos quais possam ocorrer processos de translocação bacteriana.

K. pneumoniae é um patógeno causador de IRAS. A colonização intestinal pode ser uma etapa precedente à infecção em outros sítios. Estudos comprovam que cepas contendo plasmídeos com o operon *ter*, tem forte relação com casos de infecções por *Klebsiella* spp. em humanos. Estes genes são capazes de codificar fatores que induzem resistência ao estresse oxidativo durante a colonização intestinal. O enigmático *locus ter* não é importante para cepas de *Klebsiella* quando causam pneumonia e bacteremia, mas muito importante para manutenção das cepas como colonizadoras do trato intestinal. Portanto este *locus* é dependente do fator *fitness* do microbioma intestinal (VORNHAGEN *et al.*, 2021).

Espécies de *E. coli* que carreiam o operon *ter* na sua composição genética podem transferi-lo, por via horizontal. Alguns tipos de operon *ter* foram localizados em plasmídeos e a disseminação destes foi identificada, não somente entre em *E. coli*, mas, também, entre outras espécies de Enterobactérias. As características fenotípicas, ecológicas e a relação entre os diferentes tipos operons *ter* em *E. coli* devem ser estudadas para melhor definição e entendimento (N'GUYEN *et al*., 2021).

Isso faz refletir ou reconhecer uma preocupação com o aconselhamento de antimicrobianos, pelo risco destas cepas albegarem, além de genes de virulência, também se comportam como, receptoras de genes de resistência aos antimicrobianos, sendo um problema para o tratamento das infecções e sua gravidade. Cepas de *E. coli* podem disseminar plasmídeos contendo genes de virulência como o gene *iuc* para cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* (WYRES *et al.*, 2021).

A investigação de genes do *cluster ter*, assim como sua relação com fenótipos das interações que estes podem favorecer aos patógenos, devem ser estudadas para estabelecer melhor estas relações de colonização intestinal e infecção. Conforme descrito acima, pacientes colonizados com cepas que contenham o operon *ter* podem ter um risco maior de desenvolver infecção. Intervenções que modulam a homeostase intestinal, como transplante fecal, probióticos ainda precisam ser mais estudadas para entender como os patógenos são capazes de ultrapassar a barreira da colonização intestinal (VORNHAGEN *et al.*, 2021).

Vale ressaltar a importância de analisar a CIM de K_2TeO_3 com a comparação da presença de genes do cluster *ter*, o método de Zybalski, pode contribuir, não somente para a visualização e avaliação semiquantitativa da CIM, mas, também, pode permitir uma valiosa triagem de cepas com variabilidade de resistência ao K_2TeO_3, indicando a presença de elementos genéticos associados a virulência. Já foi comprovada a relação entre CIM de K_2TeO_3 com a virulência de cepas bacterianas (WYRES *et al.*, 2021).

Algumas amostras isoladas de hemocultura apresentaram crescimento em meio contendo altas concentrações de K_2TeO_3 (25µg/mL e 112µg/mL). A resistência a este agente é comum em bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo patógenos como *Yersinia pestis*, *Shigella* e *E. coli* enterohemorrágica. Além disso, o

K_2TeO_3 é usado em meios seletivos para isolamento destes microrganismos há muito tempo (ORTH *et al.*, 2007).

Uma cepa de *K. pneumoniae* com perfil de resistência aos antimicrobianos merece destaque por sua resistência a elevadas concentrações de telurito de potássio. Este agente está associado à presença de plasmídeos em bactérias entéricas (TAYLOR *et al*., 2002). O telurito de potássio pode ser um indicador de acordo com sua concentração (altas ou baixas concentrações diluídas em meios de cultura – de 1 a 112µg/mL) tanto de resistência aos antimicrobianos e auxiliar na triagem de plasmídeos de alto peso molecular, quanto na associação de mecanismos de virulência. Além da correlação do Telurito com plasmídeos de resistência aos antimicrobianos, foi descrito acima que as cepas de *K.pneumoniae* produtoras de biofilme podem ser consideradas hipervirulentas por carrear um plasmídeo de virulência contendo genes de resistência ao telurito de potássio (PASSET; BRISSE, 2015).

Interessante que, diferentemente do que foi encontrado em pesquisas anteriores (Citações trabalhos referentes ao HUPE), em outra Instituição, nesse estudo, no Setor de Onco-pediatria, a resistência ao K_2TeO_3 (25 ug/ml), não apareceu associada à multirresistência a antimicrobianos. Detectamos, sim, amostras resistentes ao K_2TeO_3 com perfis de múltipla sensibilidade aos antimicrobianos testados. Podemos considerar que na Instituição onde foi realizada essa investigação, os predominantes perfis de extensa sensibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas de hemoculturas, relacionadas a eventos de IPCS, indicam aderência, na Instituição aos protocolos para procedimentos de assistência, a ativa prevenção e um eficiente controle de IRAS. Desta forma, a resistência ao K_2TeO_3 (25 ug/ml) pode ser cogitada como fator de virulência, de fato, independente da resistência a antimicrobianos.

Entre os genes de virulência de *E. coli* pesquisados foram encontrados apenas *iuc*D e *kps*MTII, genes associados a sideróforo e produção de cápsula, respectivamente. Esses marcadores já foram encontrados entre os quatro genes mais associados a casos de hemocultura de pacientes com sepse, em São Paulo, Brasil. Na sepse, as bactérias se valem de fatores de virulência que as habilitam a subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro (ANANIAS; YANO, 2008).

E. coli albergando o gene *kps*MTII, associado à síntese de polissacarídeos do tipo II, especificamente aqueles necessários para a síntese da cápsula K1, está relacionada a doenças extraintestinais, como infecção da corrente sanguínea, infecção do trato urinário, bacteriúria (ČUROVÁ *et al.*, 2020; NABOKA *et al.*, 2021), assim como a casos de meningite neonatal (IQBAL *et al.*, 2016).

Entre as cepas patogênicas, as ExPEC comensais, que são normalmente encontradas no trato gastrointestinal, podem causar doença quando colonizam e infectam outros sítios. Outros fatores de virulência deste patotipo são: adesinas fimbriais, sistemas de aquisição de ferro, cápsula e toxinas como a hemolisina, mas pode albergar muitos genes de virulência e é difícil ter uma classificação definida pela variedade destes genes e além dos fatores de virulência podem veicular genes de resistência aos antimicrobianos. (GALLARDO *et al.*, 2017; KHAIRY *et al.*, 2019; MANGES, 2016; MANGES *et al.*, 2019; MIRSEPASI-LAURIDSEN *et al.*, 2019; PARAMITA *et al.*, 2020; WASIŃSKI, 2019).

As ExPEC podem causar diversas infecções como sepse, meningite neonatal, prostatite, e infecção do trato urinário, sendo as mais importantes para a clínica: UPEC (quando infectam o trato urinário), as associadas à meningite neonatal e à sepse, mas também podem causar infecções no trato respiratório e outros sítios extra intestinais (JOHNSON; RUSSO, 2018; KAPER *et al.*, 2004; MALUTA *et al.*, 2014; MANGES *et al.*, 2019; PARAMITA *et al.*, 2020).

Desta forma, foram detectados alguns genes de virulência que podem sugerir este patotipo de *E. coli*, mas outros genes devem ser investigados para afirmar esta classificação nas amostras dos pacientes classificadas como IPCS. As infecções causadas por este patotipo normalmente são oportunistas e ocorrem em hospedeiros que podem apresentar neutropenia, trato urinário disfuncional ou extremos de idade, características compatíveis com os pacientes analisados (SANTOS *et al.*, 2020; WASIŃSKI, 2019). Conforme citação anterior o trato intestinal humano é a principal fonte de ExPEC (MANGES; JOHNSON, 2015).

As ExPECs apresentam plasticidade genética e variedade de fatores de virulência, tais como adesinas, toxinas, sideróforos, polissacarídeos capsulares e invasinas, que podem ser disseminados através de genes localizados em ilhas de patogenicidade (PAIs), plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis (DENAMUR *et al.*, 2021; SAROWSKA *et al.*, 2019). As cepas de ExPEC que causam

doenças em indivíduos imunocompetentes foram associados à presença de dois ou mais genes entre cinco marcadores de virulência como por exemplo: *papA* ou *papC* (fímbrias P), *sfa/foc* (S fimbriae), *afa/dra* (adesinas AFA-Dr), *iuc/iut* (aerobactina: sistema de aquisição de Ferro) e *kps*MTII (grupo capsular II), outros genes de virulência também foram descritos em ExPEC como *hly* (toxina: hemolisina) e *ompT* (subunidade T de protease de membrana externa) (JOHNSON *et al.*, 2003; KÖHLER; DOBRINDT, 2011; KOTŁOWSKI *et al.*, 2020; MIRSEPASI-LAURIDSEN *et al.*, 2019; RILEY, 2020; RUSSO; JOHNSON, 2000).

Encontrou-se pelo menos um destes genes nas cepas de *E.coli* analisadas (aerobactina em quatro amostras e grupo capsular II em 1 amostra). Em quatro cepas de *E.coli*, foi detectado gene para aerobactina, que é considerado receptor de ferro e tem sido fortemente associado à cistite, pielonefrite e bacteremia. Em um estudo realizado por Paramita *et al*. (2020), foi analisado o genoma completo de 22 cepas de *E. coli* isoladas de corrente sanguínea. Um total de cinco cepas continham genes de virulência responsáveis por sistemas de aquisição de Ferro (sideróforos – *iro*N) e quatro continham o gene *iss*, componente que promove escape do sistema imune e aumenta a sobrevivência no soro. Este gene *iss* também foi encontrado em 15 cepas que não continham genes de virulência para aquisição de Ferro (MIRSEPASI-LAURIDSEN *et al.*, 2019; PARAMITA *et al.*, 2020).

Detectamos somente alguns genes de virulência citados acima (aerobactina e capsular II) dessa forma não podemos afirmar uma classificação, mas pode-se suspeitar que estas cepas sejam caracterizadas como ExPEC, já que outros genes de virulência foram testados. Portanto é importante ressaltar que pacientes hospitalizados, principalmente os imunodeprimidos, devem receber alimentos que sejam microbiologicamente seguros (MIYAHIRA *et al.*, 2018). Já que estas estirpes de *E. coli* são consideradas extra intestinais e podem ser veiculadas também por alimentos. Quatro amostras de *E. coli* isoladas de hemoculturas dos pacientes do estudo possuem o gene de aerobactina. Cepas de *E. coli* que sintetizam aerobactina podem ter os genes responsáveis por este sistema no cromossoma e, também, em plasmídeos, permitindo a transferência horizontal deste gene de virulência para outras cepas e pode conferir vantagens para sua sobrevivência, principalmente em condições de baixa concentração de Fe, como no soro e na urina. (BRITO, B. G. *et al.*, 2004).

Meios de cultura com K_2TeO_3 (25 ug/ml) podem auxiliar no isolamento de amostras bacterianas resistentes ao estresse oxidativo, apresentando consequente resistência fagocitária e outros fatores de virulência. Consideramos que, no Setor de Onco-Hematologia - no qual a quimioterapia favorece processos de translocação de bactérias intestinais - a avaliação de processos de colonização bacteriana nas culturas fecais de controle, poderiam incluir, além da pesquisa de cepas de enterobactérias resistentes a antimicrobianos especiais, a avaliação de resistência ao K_2TeO_3 pelo fato desse marcador estar, provavelmente, associada à resistência à morte intrafagocitária, o que é especialmente relevante, na vigência de neutropenia nesses pacientes.

Estudos futuros devem investir nestas relações entre o K_2TeO_3 e a virulência de cepas bacterianas causadoras de infecções graves. O uso de concentrações menores do K_2TeO_3 deve ser levada em consideração, pois as concentrações utilizadas neste estudo foram extremamente elevadas em comparação com algumas das utilizadas pela literatura científica e pode ter diminuído a eficiência de triagem de análises de cepas virulentas. Além dos genes do cluster *ter*, a investigação de genes de elementos móveis, como IS 26, são de importância para avaliação da transmissibilidade de genes de virulência durante a colonização intestinal que, em geral**,** precede as infecções.

A investigação das CIMs de antissépticos como a clorexidina se faz necessário para o monitoramento de outros genes que podem estar associados na seleção de cepas multirresistentes, já que esta solução é amplamente utilizada e indicada para o preparo da pele na inserção, manutenção de cateteres, na prevenção de IPCS relacionadas ao CVC, causadas, tanto por bactérias Gram positivas, quanto bactérias Gram negativas. A vigilância da resistência à clorexidina é recomendada para as Instituições de saúde. Cepas bacterianas hospitalares são capazes de transferir plasmídeos de resistência aos antimicrobianos e também de virulência entre espécies de enterobactérias na microbiota intestinal. Desta forma, meios contendo telurito de potássio podem contribuir para isolamento também de cepas virulentas. A resistência ao telurito em concentração crítica (a ser determinada) pode ser potencial marcador de virulência e quando bem definidas poderão contribuir com medidas preventivas e de controle de infecção e auxiliar no tratamento dos pacientes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de cateteres de curta permanência em pacientes pediátricos hospitalizados estava mais associado aos episódios de IPCS.

As espécies mais frequentemente identificadas com aplicação da espectometria de massa em IPCS foram *K. pneumoniae* e *E. coli*.

A quase totalidade dos SCN isolados de amostras de hemocultura não estava relacionada à infecção.

O sistema VITEK® 2 System não foi capaz de identificar a espécie *Campylobacter jejuni*, confirmada pelo sequenciamento do gene 16S rDNA.

As maiores diversidades de perfis de resistência a antimicrobianos foram observadas para SCN (17 perfis), *K. pneumoniae* (4 perfis) e *E. coli* (3 perfis). A classificação de cepas multirresistentes foi realizadas através de marcadores fenotípicos e uma das limitações do estudo foi não investigar genes de resistência relacionados às IPCSs.

Assim como as CIMs de antimicrobianos, as de K_2TeO_3 são interessantes para avaliar as cepas que circulam o ambiente hospitalar e causam IRAS**.**

O Teste do fio (sugestivo de hipervirulência) foi observado aproximadamente metade das amostras de *K. pneumoniae*, e este fenótipo foi também comum em amostras com alta sensibilidade aos antimicrobianos, mas não foi possível comprovar a relação do teste do fio com a resitência ao K_2TeO_3.

Todas as amostras de *K. pneumoniae* foram capazes de produzir biofilme.

E. coli, em especial as ExPEC servem como reservatório para o desenvolvimento e mobilização de novas combinações genéticas, não somente de genes de resistência, mas, também, de genes de virulência. Estas podem se manter no intestino e migrar para outros sítios, como a corrente sanguínea e causar infecção.

Considera-se que concentrações menores do sal (K_2TeO_3) poderiam ser mais adequadas para a utilização de um potencial marcador de cepas virulentas.

A pesquisa de genes do cluster *ter*, que codifica resistência ao K_2TeO_3, assim como genes de elementos móveis, como os IS, podem auxiliar na avaliação da dinâmica de transmissão da virulência, assim como plasmídeos de virulência devem

ser estudados. Estudos devem continuar para permitir a análise e a identificação de relações entre o telurito de potássio e a virulência de cepas bacterianas causadoras de infecção.

Os experimentos adicionais são necessários para complementar ou mais adequadamente avaliar a hipótese do estudo.

O número pequeno de amostras foi insuficiente para realizar análises estatísticas associadas a resistência aos antimicrobianos, K_2TeO_3 e genes de virulência**.**

REFERÊNCIAS

AABED, K.; MOUBAYED, N.; ALZAHRANI, S. Antimicrobial resistance patterns among different *Escherichia coli* isolates in the Kingdom of Saudi Arabia. **Saudi journal of biological sciences**, p. 3776–3782, 2021.

ABOU DAGHER, G. *et al*. **Are patients with cancer with sepsis and bacteraemia at a higher risk of mortality?** A retrospective chart review of patients presenting to a tertiary care centre in Lebanon. BMJ Open, p. 7, 2017.

ALP, S.; AKOVA, M. **Management of febrile neutropenia in the era of bacterial resistance**. Therapeutic Advances in Infectious Disease, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4040719/>. Acesso em: 14 jun. 2019.

AMANCIO, L. *et al*. Epidemiological surveillance of health care-associated infections in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation unit in South Brazil*.* **Transpl. Infect Dis**., 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33249699/>. Acesso em: 14 jan. 2021.

ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with sepsis. Brazilian. **Journal of Medical and Biological Research**, p. 877-883, 2008.

ANDRADE, M. M. *et al.* The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale**, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7563066/>. Acesso em: 23 jun. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **A ANVISA esclarece sobre as Soluções tópicas com Clorexidina**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/cosmetovigilancia/orientacoes-e-formularios/programa-clorexidina.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2019.

_____. **Boletim Informativo**: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Avaliação dos indicadores nacionais de infecção relacionada à assistência ano de 2014 e relatório de progresso. nº 14. 2016. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/11-boletim-informativo-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude>. Acesso em: 04 jan. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução da Diretoria Colegiada – RPC nº 36, de 25 de julho de 2013**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0036_25_07_2013.htm> . Acesso em: 23 out. 2022.

_____. Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Efeitos Adversos - UIPEA. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde - GGTES. **Corrente Sanguínea**: Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. 2008. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/criterios_diagnosticos_infeccoes_assistencia_saude.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2019.

_____. Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Efeitos Adversos - UIPEA .Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde - GGTES. **Manual de medidas de prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Cap. 3, cad. 4, 2017.

ASANTE, J. *et al*. **Multidrug-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bloodstream in the uMgungundlovu District of KwaZulu-Natal Province in South Africa**: Emerging Pathogens. Antibiotics (Basel), 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33670659/>. Acesso em: 06 jun. 2019.

BAIER, C.. *et al*. **Incidence, risk factors and healthcare costs of central line associated nosocomial bloodstream infections in hematologic and oncologic patients**, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6980604/>. Acesso em: 18 set. 2019.

BERNARDI, A. C. A.; PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. **Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central.** *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* v. 28, n.1, p.57-66, 2007.

BERNARDI, A. C. A.; PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. Identificação de cocos aeróbios Gram-positivos, catalase positiva com implicação em processos infecciosos. **Rev. Ciênc. Farm**. 2005. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-314685>. Acesso em: 14 jan. 2019.

CAO, X. *et al*. Detection of a clinical carbapenem-resistant Citrobacter portucalensis strain and the dissemination of Citrobacter portucalensis in clinical settings. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521001284>. Acesso em: 22 nov. 2021.

CARVALHO, A. S. *et al*. **Bloodstream infections in neutropenic patients with haematological malignancies.** Infect Dis Health. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31586572/>. Acesso em: 22 nov. 2021.

CARVALHO, R. V. **Infecções por corinebactérias não diftéricas em cateter venoso central de pacientes oncológicos pediátricos**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

CHARTTERJEE, S. S.; OTTO, M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. **Clinical Epidemiology**. v.5., p.205-217, 2013.

CHEN, Y. *et al*. **Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae***. p. 189-198, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15276215/>. Acesso em: 12 set. 2021.

CHISTI, M. J. *et al*. **Antibiotic-Resistant Bacteremia in Young Children Hospitalized With Pneumonia in Bangladesh Is Associated With a High Mortality Rate**. Open Forum Infect Dis. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34277885/>. Acesso em: 14 jan. 2019.

CHOPRA, T.*et al*. **Impact of cefepime therapy on mortality among patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22547616/>. Acesso em: 23 nov. 2021.

CORTES, M. E.; BONILLA, J. C.; SINISTERRA, R. D. **Biofilm formation, control and novel strategies for eradication**. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. V. 2, p. 896-905, 2011. Disponível em: <https://khorraman.ir/sites/default/files/articles/Dentol/5.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2022.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S. **Battling biofilms**. Sci. Am. v. 285, p. 74-81, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11432197/>. Acesso em: 06 jun. 2019.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, p. 1318-1322, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10334980/>. Acesso em: 08 mar. 2019.

CROXEN, M. A. *et al*. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli.* **Clinical Microbiology Reviews**. v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24092857/>. Acesso em: 14 jan. 2019.

CUI, J. *et al*. **The proportion, species distribution and dynamic trends of bloodstream infection cases in a tertiary hospital in China**, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34184182/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

ČUROVÁ, K. *et al*. Virulence, phylogenetic background and antimicrobial resistance in Escherichia coli associated with extraintestinal infections. **Journal of infection and public health**, p.1537-1543, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32690453/>. Acesso em: 12 set. 2021.

DIAS, R.C.B. *et al*. **Diarrheagenic E*scherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical Enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo state, Brazil**. p. 299-308, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26752102/>. Acesso em: 08 mar. 2019.

DRAMOWSKI, A. *et al*. Impact of 1% chlorhexidine gluconate bathing and emollient application on bacterial pathogen colonization dynamics in hospitalized preterm neonates - A pilot clinical trial. **EClinicalMedicine**. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34195575/>. Acesso em: 21 set. 2021.

EDA, R. *et al*. Trends and molecular characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Japanese hospital from 2006 to 2015. ***Journal of infection and chemotherapy****: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, p. 667-671, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32222331/>. Acesso em: 14 jan. 2019.

FACCIOLÀ, A. *et al*. The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature*.* **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v. 23, n. 3, p. 1266-1278, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30779096/>. Acesso em: 03 jul. 2022.

FEBBRARO, F. *et al***. MALDI-TOF MS Versus VITEK®2: Comparison of Systems for the Identification of Microorganisms Responsible for Bacteremia**. **Curr Microbiol**. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-016-1121-x>. Acesso em: 14 jan. 2019.

FERREIRA, M. *et al*. **Epidemiology of bacteremia in a pediatric population - A 10-year study**. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34275687/>. Acesso em: 17 fev. 2021.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol**. v. 8, p. 623-633, 2010.

FRASER, J. L. *et al*. **Healthcare-associated outbreaks of bacterial infections in Africa, 2009-2018: A review**. Int J Infect Dis., p. 469-477, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33333248/>. Acesso em: 15 set. 2022.

GARZA-GONZÁLEZ, E. *et al*. **Comparison of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and the Vitek 2 System for Routine Identification of Clinically Relevant Bacteria and Yeast**. Ann Clin Lab Sci., p. 119-127, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32161020/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

GHITA, B. T. *et al*. **Molecular Serotyping and Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolated in Hospital Catering Service in Morocco**. Int J Microbiol., n. 5, p. 961-521, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32922448/>. Acesso em: 15 set. 2022.

GILBERT, R.E. *et al*. **Impregnated central venous catheters for prevention of bloodstream infection in children (the CATCH trial)**: a randomised controlled trial. Lancet, p. 387, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26946925/>. Acesso em: 25 abr. 2021.

GONÇALVES, D. V. **Caracterização e detecção de genes codificando enzimas modificadoras de aminoglicosídeos em enterobactérias multirresistentes a agentes antimicrobianos no ambiente hospitalar**. 2012. 86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

HARMER, C. J.; HALL, R. M. **IS26-mediated formation of transposons carrying antibiotic resistance genes**. Applied and Environmental Science, p.1-8, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27303727/>. Acesso em: 03 jul. 2022.

_____. MORAN, R. A.; HALL, R. **Movement of IS26-associated antibiotic resistance genes occurs via a translocable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26**. mBIO, v.5, p. 1-9, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25293759/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. **Are coagulase-negative staphylococci virulent?** Clinical Microbiology and Infection, p. 1071 e 1080, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30502487/>. Acesso em: 14 jan. 2019.

HEINZ, W. J. *et al*. **Diagnosis and empirical treatment of fever of unknown origin (FUO) in adult neutropenic patients: guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO).** Ann. Hematol., p. 1775-1792, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28856437/>. Acesso em: 25 abr. 2021.

HERNÁNDEZ-ACEITUNO, A. *et al*. **Effectiveness of a bundle of measures for reducing central line-associated bloodstream infections**. Rev Esp Anestesiol Reanim., p. 227-236, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32216956/>. Acesso em: 08 mar. 2019.

HØIBY, T. *et al*. **ESCMID. Guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014**. Clin. Microbiol. Infect., 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25596784/>. Acesso em: 01 ago. 2022.

HONG, S. I. *et al*. **Clinical and Molecular Characteristics of qacA- and qacB-Positive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Causing Bloodstream Infections**. Antimicrob Agents Chemother. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30718251/>. Acesso em: 22 nov. 2021.

IQBAL, J. *et al*. **Lethal neonatal meningoencephalitis caused by multi-drug resistant, highly virulent Escherichia coli.** Infectious diseases (London, England), p. 461-466, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4818964/>. Acesso em: 23 out. 2022.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. **Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise**. J Infect Dis., p. 261-72, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10608775/>. Acesso em: 14 jan. 2019.

KADRY, A. A.; AL-KASHEF, N. M.; EL-GANINY, A. M. **Distribution of genes encoding adhesins and biofilm formation capacity among Uropathogenic *Escherichia coli* isolates in relation to the antimicrobial resistance**. Afri Health Sci., p. 238-247, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33402912/>. Acesso em: 16 jun. 2019.

KAR, Y. D.; ÖZDEMIR, Z. C.; BÖR, Ö. **Evaluation of febrile neutropenic attacks of pediatric hematology-oncology patients**. Turk Pediatrics Ar., p. 213–220, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29483801/>. Acesso em: 12 set. 2021.

KATONGOLE, P. *et al*. **Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic Escherichia coli isolated from clinical isolates in Uganda**. BMC Infect Dis., p. 453, 2020. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-05186-1>. Acesso em: 23 nov. 2021.

KENGEN, R. *et al***. Chlorhexidine washing in intensive care does not reduce bloodstream infections, blood culture contamination and drug-resistant microorganism acquisition:** an interrupted time series analysis. Crit Care Resusc., p. 231-240, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30153786/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pac J Trop Biomed.**, p. 478-482, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169116309509>. Acesso em: 08 mar. 2019.

KIM, P. J.; STEINBERG, J. S. Wound care: biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot. **Semin. Vasc. Surg.**, v. 25, p. 70-74, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22817855/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

KOH, F. X. *et al*. Francisella spp. detected in Dermacentor ticks in Malaysian forest reserve areas. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports**., v. 17, 2019 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2405939018301588>. Acesso em: 25 abr. 2021.

KOIKE, H.; CHIBA, A.; KATSUNO, M. Emerging Infection, Vaccination, and Guillain-Barré Syndrome: A Review. **Neurol Ther.**, p. 1-15, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34117994/>. Acesso em: 20 jul. 2022.

KOREM, M. *et al*. Misidentification of Candida dubliniensis isolates with the VITEK MS. **J. Mycol. Med.**, p. 101-107, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33388671/>. Acesso em: 25 abr. 2021.

LENDAK, D. *et al*. Changing epidemiology of catheter-related bloodstream infections in neutropenic oncohematological patients. **PLoS One.**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33930068/>. Acesso em: 03 jul. 2022.

LOLI, A. *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, p. 268-281, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21793988/>. Acesso em: 15 set. 2022.

MARTORA, F. *et al*. Campylobacter jejuni bacteremia in Italian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: Report of two cases. **New Microbiol.**, p. 96-98, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32310303/>. Acesso em: 17 fev. 2021.

MELO, S. A. C. *et al*. Use of a selective medium with potassium tellurite to follow intestinal colonization of hospitalized patients by drug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, p.135-140, 1993. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/6SYJ7GRgyCRvPxHRXrvMGGC/?lang=en>. Acesso em: 01 ago. 2022.

MENOITA, E. C.; TESTAS, J. C. Biofilmes: conhecer a entidade. In: _____ (Org.). **Gestão de Feridas Complexas**. Lisboa: Lusodidacta, 2015. p. 271-278.

MIKULSKA, M. *et al*. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. **J. Infect.**, p. 321–331, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24370562/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

MIRIAGOU, V. *et al*. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. **Antimicrob. Agentes Chemother**, p. 3541-3543, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16048979/>. Acesso em: 14 jan. 2019.

MISHRA, S.; HORSWILL, A. R. **Heparin Mimics Extracellular DNA in Binding to Cell Surface-Localized Proteins and Promoting *Staphylococcus aureus*. Biofilm Formation.** v.2, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28656173/>. Acesso em: 08 mar. 2019.

MIYAZAKI, N. H. T. *et al*. The presence of qacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online], v. 102, n. 4, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/GY3RpDxqxBBHcNfB69YZv4h/?lang=en>. Acesso em: 10 fev. 2022.

MOSKALEWICZ, R. L. *et al*. Bacteremia in nonneutropenic pediatric oncology patients with central venous catheters in the ED. **Am. J. Emerg. Med.**, p. 20-24. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27765482/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

MUKHERJEE, S. *et al*. Neonatal Sepsis: The Impact of Carbapenem-Resistant and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Medicine**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34179032/>. Acesso em: 17 fev. 2021.

MURRAY, P. What is a new in clinical microbiology – Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v.14, n. 5, p.419-423, 2012. ISSN15251578.

N'GUYEN, Y. *et al*. Coagulase-negative Staphylococcus bacteraemia accounts for one third of Staphylococcus bacteraemia in a French university hospital. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, p. 79–85, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22017739/>. Acesso em: 23 nov. 2021.

NABOKA, Y. L. *et al*. The gene profile of *Enterobacteriaceae* virulence factors in relation to bacteriuria levels between the acute episodes of recurrent uncomplicated lower urinary tract infection. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 19, n. 8, p. 1061–1066, Aug. 2021. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33338384/>. Acesso em: 23 out. 2022.

OLOWO-OKERE, A.; IBRAHIM, Y.; OLAYINKA, B. O. Molecular characterisation of extended-spectrum β-lactamase-producing Gram-negative bacterial isolates from surgical wounds of patients at a hospital in North Central Nigeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, p. 85-89, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29438821/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

ORTH, D. *et al*. Variability in tellurite resistance and the ter gene cluster among Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from humans, animals and food. **Research in microbiology**, p.105–111, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17317110/>. Acesso em: 12 set. 2021.

ÖZALP GERÇEKER, G. YARDIMCI, F.; AYDINOK, Y. Central Line-Associated Bloodstream Infections in Children With Hematologic and Oncologic Diseases: First Prevalence Results From a University Hospital. **Journal Pediatr. Oncol. Nurs**., p. 327-336, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31027430/>. Acesso em: 23 out. 2022.

PASSET, V.; BRISSE, S. Association of tellurite resistance with hypervirulent clonal groups of Klebsiella pneumoniae. **Journal of clinical microbiology**, p. 1380–1382, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25631812/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

PATEL, P. K.; RUSSO, T. A.; KARCHMER, A. W. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae. **Asm Jornals. Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, 2014. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00001-19>. Acesso em: 17 fev. 2021.

PENG, X. *et al*. Epidemiology, risk factors and outcomes of bloodstream infection caused by ESKAPEEc pathogens among hospitalized children. **BMC Pediatr**., p. 188, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8059001/>. Acesso em: 22 nov. 2021.

PERCIVAL, S. L. *et al*. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. **Journal Med. Microbiol**., p. 323-334, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25670813/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

PEREIRA, J. A. A. **Estudo epidemiológico da infecção hospitalar e resistência a antimicrobianos e ao telurito em *Enterobacteriaceae* com referência especial a *Klebsiella pneumoniae***. 1990. 174 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1990.

_____. Estudo epidemiológico da infecção hospitalar e resistência a antimicrobianos e ao telurito em *Enterobacteiacea*e com referência especial a *Klebsiella pneumoniae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 263-265, 1993.

_____; SUASSUNA, I. Biotipagem e resistotipagem para o traçado epidemiológico da origem fecal de *Klebsiella pneumoniae* em infecções urinárias. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 80, n. 3. p. 313-320, 1985. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/LkW5q4WPfYv7sYRc9TgR4nK/?lang=pt>. Acesso em: 12 set. 2021.

PISIPATI, S.; ZAFAR, A.; ZAFAR, Y. **Campylobacter coli bacteraemia**: how common is it? BMJ Case Rep., 2020. Disponível em: <https://casereports.bmj.com/content/13/12/e236634>. Acesso em: 08 mar. 2019.

RAAD, C. *et al*. Trends in bacterial bloodstream infections and resistance in immuno-compromised patients with febrile neutropenia: a retrospective analysis. **Eur. J. Pediatr.**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33835249/>. Acesso em: 12 set. 2021.

RAMOS-ZAYAS, A. *et al*. The Impact of Healthcare-Associated Infections in Patients Undergoing Oncological Microvascular Head and Neck Reconstruction: A Prospective Multicentre Study. **Cancers (Basel)**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33925543/>. Acesso em: 01 ago. 2022.

REID, J. C. *et al*. Porcine commensal Escherichia coli: a reservoir for class 1 integrons associated with IS26. **Microbial Genomics**, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29306352/>. Acesso em: 25 abr. 2021.

REIF, K. E. *et al*. *Francisella tularensis* novicida infection competence differs in cell lines derived from United States populations of Dermacentor andersoni and Ixodes scapularis. **Sci Rep.**, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30140074/>. Acesso em: 03 jul. 2022.

ROSSI, F. *et al*. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **The New England Journal of Medicine**, p. 1524–1531, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24738669/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

RUDOLPH, W. W. *et al*. Comparison of VITEK 2, MALDI-TOF MS, 16S rRNA gene sequencing, and whole-genome sequencing for identification of Roseomonas mucosa. **Microb. Pathog.**, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31185244/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

SANTOS, L. S. *et al*. *Corynebacterium diphtheriae* putative tellurite-resistance protein (CDCE8392_0813) contributes to the intracellular survival in human epithelial cells and lethality of Caenorhabditis elegans. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, p. 662-668, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/xK4bkCKkVBfRG6rL3sgD3km/?lang=en>. Acesso em: 23 nov. 2021.

SAROWSKA, J. *et al*. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. **Gut Pathog.**, p. 11-10, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30828388/>. Acesso em: 12 set. 2021.

SHANG, S. *et al*. Rapid diagnosis of bacterial sepsis with PCR amplification and microarray hybridization in 16S rRNA Gene. **Pediatric Research**, v. 58, n. 1, p.143-148, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/pr2005219>**.** Acesso em: 03 jul. 2022.

SHANKAR, C. *et al*. Whole genome analysis of hypervirulent Klebsiella pneumoniae isolates from community and hospital acquired bloodstream infection. **BMC microbiology**, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29433440/>. Acesso em: 14 jul. 2022.

SHIN, J. H. *et al*. Performance Evaluation of VITEK MS for the Identification of a Wide Spectrum of Clinically Relevant Filamentous Fungi Using a Korean Collection. **Ann. Lab. Med.**, p. 214-220, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33063683/>. Acesso em: 08 mar. 2019.

SHON, A. S.; RAJINDER, P. S.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *pneumoniae*: *a* new and dangerous breed. **Virulence**, p.107-118, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23302790/>. Acesso em: 22 nov. 2021.

SILVA, N. C. Z da. *et al*. The impact of ageing on the incidence and mortality rate of bloodstream infection: A hospital-based case-cohort study in a tertiary public hospital of Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34218504/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

SNARSKI, E. *et al*. Current practices used for the prevention of central venous catheter-associated infection in hematopoietic stem cell transplantation recipients: A survey from the Infectious Diseases Working Party and Nurses' Group of EBMT. **Transpl. Infect. Dis.**, p. 558-565, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25953418/>. Acesso em: 23 nov. 2021.

SONG, Z. *et al*. Copper Ions Facilitate the Conjugative Transfer of SXT/R391 Integrative and Conjugative Element Across Bacterial Genera. **Front Microbiol.**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33603719/>. Acesso em: 12 set. 2021.

STEPANOVIC, S. *et al*. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods.**, v. 40, p.175-179, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10699673/>. Acesso em: 12 set. 2021.

SZYBALSKI, W.; BRYSON, V. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. Cross resistance of Escherichia coli to 15 antibiotics. **Jornal of Bacteriology**, p. 489-499, 1952. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC169383/>. Acesso em: 06 jun. 2019.

TASSIOS, P. T.; MIRIAGOU, V. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 669–672, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/58/3/669/749029>. Acesso em: 14 jan. 2019.

TAYLOR, D. E. Bacterial tellurite resistance. **Trends in Microbiology**, p.111-115, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10203839/>. Acesso em: 23 out. 2022.

_____. *et al.* Location of a tellurite resistance operon (tehAtehB0 within the terminus of *Escherichia coli* K12. **J. Bacteriol.**, p. 2740-2742, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8169225/>. Acesso em: 22 nov. 2021.

TAYLOR, D. E. *et al*. Genomic Variability of O Islands Encoding Tellurite Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 17, p. 4690-4698, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC135296/>. Acesso em: 01 ago. 2022.

THURMAN, C.B. *et al*. Risk for Health Care-Associated Bloodstream Infections in Pediatric Oncology Patients with Various Malignancies. **J. Pediatric. Oncol. Nurs.**, p. 196-202, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28038498/>. Acesso em: 17 fev. 2021.

TORO, M. *et al*. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile. **Food Microbiol.**, p. 55-60, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30056963/>. Acesso em: 15 set. 2022.

VALKOVÀ, D. *et al*. The contribution of the tellurite resistance genes to the fitness of *Escherichia coli* uropathogenic strains. **Central European Journal of Biology**, p.182-191, 2007. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11535-007-0019-9/html>. Acesso em: 03 jul. 2022.

VÁZQUEZ-LÓPEZ, R. *et al*. Antibiotic-Resistant Septicemia in Pediatric Oncology Patients Associated with Post-Therapeutic Neutropenic Fever. **Antibiotics**, p.106, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6783913/>. Acesso em: 25 abr. 2021.

VIEIRA, L. A. *et al*. Newborn intestinal colonization by multidrug resistant enterobacteriaceae in a neonatal unit. **Jornal de Pediatria**, n. 2, v. 75, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14685546/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

VIJAYAKUMAR, R. *et al*. Distribution of biocide resistant genes and biocides susceptibility in multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: A first report from the Kingdom of Saudi Arabia. **Journal of Infection and Public Health**, p. 812–816, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29907439/>. Acesso em: 08 mar. 2019.

_____. *et al*. Determination of minimum inhibitory concentrations of common biocides to multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Journal of Infection and Public Health**, p. 812-816, 2018. Disponível em: <https://www.bibliomed.org/?mno=241032>. Acesso em: 10 fev. 2022.

WHITBY, P. W. *et al*. Characterization of the *Haemophilus influenzae* tehB gene and its role in virulence. **Microbiology**, p.1188-1200, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2889444/>. Acesso em: 23 nov. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp. Mol. Pathol.**, p. 11-19, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18482721/>. Acesso em: 08 mar. 2019.

WU, B. *et al*. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei*, China. **Emerg. Infect. Dis.**, p. 964-966, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6359878/>. Acesso em: 23 nov. 2021.

ZADIK, P. M.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. **J. Med. Microbiol**., p.155-158, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8345511/>. Acesso em: 06 jun. 2019.

ZIEGLER, M.J.; PELLEGRINI. D, C.; SAFDAR, N. Attributable mortality of central line associated bloodstream infection: systematic review and meta-analysis. **Infection**, p. 29-36, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25331552/>. Acesso em: 23 out. 2022.

ZUMA, A. *et al*. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Rio de Janeiro displaying susceptibility profiles to non-β-lactam antibiotics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 237–241, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/bNQZTx6nchMxScNZH7ybvWC/?lang=en>. Acesso em: 17 fev. 2021.

ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética

UERJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de espécies e caracterização de fatores de virulência de microrganismos Gram positivos e Gram negativos isolados de hemoculturas de pacientes pediátricos hospitalizados

Pesquisador: Bianca de Oliveira Fonseca

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41955320.4.0000.5259

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.502.848

Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo registrado no protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil.

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um grave problema de Saúde Pública. As infecções primárias da corrente sanguínea (IPCSs) podem ser prevenívels quando medidas efetivas são reconhecidas pelos profissionais de saúde. Segundo a ANVISA as IPCSs mais prevalentes em UTI pediátricas são as de confirmação laboratorial, sendo os Staphylococcus coagulase negativo (ScoN) a bactéria mais isolada (19,8%) seguida de K. Pneumoniae (17,7%). Infecções por espécies de ScoN tem aumentado em relação aos casos de infecções por S.aureus.

Pacientes pediátricos, principalmente, aqueles acometidos pelo câncer, necessitam do uso de cateteres venosos centrais (CVCs) para seu tratamento e as infecções relacionadas a estes dispositivos podem representar complicações graves. O investimento pessoal e material nos laboratórios são necessários para a identificação bacteriana, incluindo também a agentes bacterianos negligenciados, bem como portadores de genes de resistência, especialmente bactérias Gram negativas, como as enterobactérias. Técnicas

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **E-mail:** cep.hupe.interno@gmail.com

de biologia molecular agilizam e melhoram a
acurácia na identificação desses espécimes clínicos. O uso de meios contendo telurito além de auxiliar na identificação de corineformes também
contribui para isolamento de outras espécies bacterianas, principalmente enterobactérias multirresistentes e pode assim contribuir na investigação
não somente da resistência bacteriana mas de determinantes de virulência como biofilmes e resistência a agentes oxidantes, que está veiculada a
transferência de elementos genéticos móveis como o IS26, que possibilitam a viabilidade destes patógenos no ambiente hospitalar. Esse projeto tem
como objetivo identificar as espécies bacterianas isoladas de pacientes pediátricos hospitalizados e caracterizar os seguintes determinantes de
virulência: genes de resistência, biofilme, resistência a agentes oxidativos e produção de toxinas. Para execução deste projeto utilizaremos reações
de polimerase em cadeia para identificação de agentes bacterianos e detecção de genes resistência, genes codificantes de determinantes de
virulência e detecção de elementos genéticos móveis. Adicionalmente verificaremos a formação de biofilme e examinaremos a dinâmica de sua
formação por microscopia confocal de varredura a laser. Além disso, determinaremos a concentração inibitória mínima (CIM) das células
planctônicas e a concentração mínima para erradicação de biofilme (CMEB) para os antimicrobianos conforme indicação do CLSI. Avaliaremos a
resistência a agentes oxidantes e seus geradores (telurito de potássio, selenito, peróxido de hidrogênio e paraquate). Os resultados das etapas
citadas acima serão correlacionados com fatores reconhecidos para risco de IRAS/IPCS a partir dos dados contidos no cadastro das cepas na
bacterioteca. As cepas bacterianas isoladas de hemoculturas encontram-se na bacterioteca do Laboratório de Resistência Bacteriana estocadas
para as análises fenotípicas e genotípicas posteriores. O presente projeto visa contribuir na elaboração de medidas preventivas, de controle e
terapêuticas desses pacientes pediátricos em uso de cateter.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O estudo tem como objetivo geral a identificação de espécies e caracterização de fatores de virulência de microrganismos Gram positivos e Gram
negativos isoladas de hemoculturas de pacientes pediátricos hospitalizados. Neste sentido serão investigados os aspectos dos seguintes
determinantes de virulência: detecção de genes de resistência, biofilme, resistência a agentes oxidantes e produção de toxinas.
Objetivo Secundário:
- identificar espécies bacterianas através de métodos fenotípicos e genotípicos- investigar a resistência bacteriana a espécies reativas de oxigênio
e seus geradores (telurito de potássio, selenito, peróxido de hidrogênio e paraquate);- Analisar qualitativa e quantitativamente a produção biofilme
em substratos abióticos diversos;- Examinar a dinâmica da formação de biofilme das cepas produtoras de biofilme através de microscopia confocal
de varredura a laser (MCVL);- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Mínima para Erradicação do Biofilme (CMEB)
frente a diferentes antimicrobianos; - Realizar análise de bioinformática para o desenvolvimento de oligonucleotídeos (primers) para detecção de
genes codificadores de multirresistência;- Caracterização através de métodos moleculares do Staphylococcal Cassette Chromossome mec
(SCCmec) e da toxina de Panton-Valentine leukocidin (PVL), além de genes de virulência nas cepas de Staphylococcus coagulase negativo e
S.aureus sensíveis e resistentes a oxacilina; - Correlacionar os dados acima mencionados com fatores reconhecidos para risco de IRAS/IPCS a
partir dos dados contidos no cadastro das cepas na bacterioteca.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco refere-se a quebra de sigilo referente aos dados cedidos pela instituição co-participante. Todavia, ressalta-se que o nome da instituição em
apreço não será citada e os dados serão manipulados somente pela equipe pesquisadora responsável e não possibilitam nenhuma identificação.

Benefícios:

O estudo poderá permitir um entendimento da patogênese das IPCS frequentemente

associadas/relacionadas ao uso de cateteres venosos. É de
suma importantância reconhecer a associação de mecanismos genéticos e de virulência bacteriana, que poderão contribuir para o estabelecimento
das estratégias que possam auxiliar na prevenção e tratamento das IPCS.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este estudo visa à caracterização dos perfis de sensibilidade e resistência a antimicrobianos e virulência, a partir de técnicas fenotípicas e
genotípicas, de cepas bacterianas Gram positivas e negativas isolados de hemoculturas de pacientes pediátricos de um Hospital Federal do Rio de
Janeiro.O estudo tem a proposta de analisar isolados bacterianos de hemoculturas referente ao período de 2015-2016 (agosto de 2015 a agosto de
2016), ou seja, 12 meses. A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: Documento devidamente preenchido, datado e assinado

2) Projeto de Pesquisa: Adequado

3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado/apresentado

4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado

5) Cronograma: Adequado

6) Documentos pertinentes à inclusão do HUPE: Adequado

7) Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: anexados e conforme as normas.

Os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos dados necessários para apreciação ética e tendo sido avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

RIO DE JANEIRO, 19 de Janeiro de 2021

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **E-mail:** ceo.hupe.interno@gmail.com