



## ARTIGO ORIGINAL

## Colonização intestinal de recém-natos por enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos em unidade neonatal

*Newborn intestinal colonization by multidrug resistant enterobacteria in a neonatal unit*

Lúcio A. Vieira<sup>1</sup>, Eduardo A.R. de Castro<sup>2</sup>, José L.B. Duarte<sup>3</sup>, Sebastião R. Pinheiro<sup>4</sup>, Ítalo Suassuna<sup>5</sup>, José A.A. Pereira<sup>5</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Buscamos avaliar a ocorrência de colonização intestinal de recém-natos por cepas de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos (CEMA) no curso da hospitalização. Utilizamos meios de cultura seletivos, tentando correlacionar o isolamento de tais cepas bacterianas a alguns presumíveis fatores de risco para a colonização.

**Métodos:** Realizamos um estudo de inclusão seqüencial de 30 recém-nascidos internados no Berçário do HUPE-UERJ, hospital universitário público, terciário, de 600 leitos. Obtínhamos informações clínico-epidemiológicas e coletávamos uma amostra fecal de cada recém-nascido, que eram semeadas em meios de cultura contendo gentamicina (8mg/ml) ou telurito de potássio (25mg/ml). As cepas isoladas foram submetidas à identificação bioquímica e a testes de sensibilidade a antimicrobianos. Nove CEMA foram submetidas a ensaios de transferência da resistência plasmidial por conjugação bacteriana.

**Resultados:** Detectamos 56 cepas de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos em 14 dos 30 recém-nascidos estudados (46,7%). *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie bacteriana mais frequentemente isolada (68%). Constatamos a associação entre o isolamento de CEMA e a presença de 3 ou 4 dos seguintes fatores de risco para a colonização: uso de antimicrobianos, baixo peso (<2500g), hospitalização por mais do que 6 dias e alimentação com leite artificial (p<0,02). Para 8 de 9 CEMA, obtivemos transferência da resistência plasmidial por conjugação bacteriana.

**Conclusões:** Os meios de cultura seletivos contribuíram na constatação de uma alta frequência de colonização intestinal de recém-nascidos hospitalizados por espécies de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos associáveis a um conjunto de fatores já bem reconhecidos como de risco para infecções. Isso confirma a necessidade de reforço das medidas de controle de transmissão de microrganismos visando a prevenção de condições predisponentes para infecções, endêmicas ou epidêmicas por cepas hospitalares.

*J. pediatr. (Rio J.). 1999; 75(2):83-90: recém-nascidos, fatores de risco.*

### Abstract

**Objective:** To evaluate the occurrence of intestinal colonization in newborns by multidrug-resistant enterobacteria strains (MDRES) during hospital stay after birth. We used selective media in an attempt to determine the relationship between isolation of these strains and some of the presumed colonization risk factors.

**Method:** A sequential inclusion study of 30 newborns was carried out in the neonatal unit of the HUPE, State University Hospital, a general 600-bed tertiary care hospital. We obtained clinical and epidemiological information from medical records and collected a fecal sample from each newborn, which was plated in gentamicin (8mg/ml) medium and potassium tellurite (25mg/ml) medium. The isolated strains were biochemically identified and also submitted to tests of antimicrobial susceptibility. Nine MDRES were submitted to an assay for plasmid conjugational transfer.

**Results:** We isolated 56 distinct MDRES from 14 among 30 newborns (46.7%). *Klebsiella pneumoniae* was the most common bacterial species (38/56 (68%)). We found statistical association between individual MDRES isolation and presence of 3 or 4 of the following colonization risk factors considered: antimicrobial use, low weight (<2.500g), more than 6 days of hospitalization and artificial milk feeding (p<0.02). We could detect plasmid resistance transfer by bacterial conjugation for 8 among 9 MDRES.

**Conclusion:** The selective cultura media were useful to detect the high frequency of newborns colonized by MDRES in association with well established infection risk factors. We emphasize the importance of reinforcing control rules aiming at preventing intestinal colonization viewed as a risk of nosocomial infection.

*J. pediatr. (Rio J.). 1999; 75(2):83-90: newborn, risk factors.*

1. Bacharel Biologia-UERJ.

2. Médico SCIH/HUPE-UERJ.

3. Prof. Auxiliar de Neonatologia e Chefe Berçário HUPE-UERJ.

4. Bacharelado em Biologia-UERJ.

5. Prof. Titular Microbiologia e Imunologia-UERJ.

6. Prof. Adjunto Microbiologia e Imunologia-UERJ.

Apoio: FAPERJ/SR2-UERJ.

### Introdução

As infecções hospitalares representam preocupante problema na atualidade, tendo como resultado maior duração da hospitalização, elevação de custos de internações e maior morbidade/mortalidade hospitalar<sup>1,2</sup>. Uma das ques-

tões de maior relevância refere-se ao mais freqüente isolamento de germes multirresistentes a antimicrobianos, a partir de espécimes clínicos de pacientes<sup>3</sup>. Em alguns casos, isolam-se germes resistentes a todos os antimicrobianos utilizados na terapêutica, por exemplo, o isolamento de enterococos resistentes à vancomicina<sup>4</sup>.

A colonização por germes, incluindo-se os multirresistentes a antimicrobianos, como etapa anterior ao estabelecimento de infecção, é fenômeno de reconhecida importância no ambiente hospitalar. A aquisição de flora hospitalar pode se dar a partir de alimentos, materiais hospitalares, fluidos terapêuticos e, de forma particularmente relevante, pelas mãos<sup>5,6</sup>. A constituição de microbiotas intestinais de recém-nascidos pode ser profundamente alterada pela ação de antimicrobianos favorecendo o processo de colonização por cepas multirresistentes<sup>7</sup>. Sakata et al.<sup>8</sup> constataram que o uso de alguns antimicrobianos, em particular, estava associado à substituição de *Escherichia coli* por *Klebsiella pneumoniae*, nas composições de microbiotas fecais de crianças<sup>8,9</sup>.

A multirresistência a antimicrobianos é codificada em elementos genéticos bacterianos, freqüentemente transferíveis. Tais elementos podem sofrer processos de recombinação genética levando à constituição de "blocos" de genes de resistência, favorecidos pela seleção decorrente da utilização de antimicrobianos, principalmente, de amplo espectro<sup>10,11</sup>.

Em investigação anterior procuramos avaliar a colonização de pacientes de diversos serviços clínicos do HUPE-UERJ, inclusive recém-nascidos, com menos de 48 hs e com mais de 7 dias de hospitalização, por germes multirresistentes, utilizando meio de cultura seletivo contendo 25 mg/ml de telurito de potássio<sup>12</sup>, tendo-se em conta que a resistência a esse sal aparece como um indicador da multirresistência bacteriana a antimicrobianos. Neste trabalho, avaliamos a ocorrência de colonização intestinal, em recém-nascidos, por germes multirresistentes a antimicrobianos utilizando dois meios de cultura seletivos: um, contendo telurito de potássio, e outro, contendo gentamicina. Consideramos a colonização bacteriana de recém-nascidos hospitalizados um relevante problema de risco para infecção e, também, um modelo útil de abordagem do fenômeno colonização hospitalar por estarem no início do processo de estabelecimento de microbiota intestinal.

## Métodos

**Pacientes:** Foram analisadas amostras fecais, em estudo de inclusão seqüencial de 30 recém-nascidos, com ou sem complicações clínico-laboratoriais, do Berçário do HUPE-UERJ, hospital público terciário de 600 leitos, entre janeiro e novembro de 1991. Na ocasião, o Berçário tinha capacidade para 20 recém-nascidos, com média de permanência de, aproximadamente, 7 dias. De cada recém-nascido foi obtida uma amostra de fezes. Obtivemos

informações referentes ao peso ao nascer, à duração da permanência hospitalar, ao tipo de alimentação (aleitamento materno, artificial ou ambos) ou sua suspensão, ao tipo de parto realizado, à ocasião do rompimento de bolsa (prévia ao parto ou durante o mesmo), às patologias e complicações clínicas e à eventual utilização de antimicrobianos pelo recém-nascido. O estabelecimento do total de 30 amostras fecais de recém-nascidos teve como base a freqüência (alta) de recém-nascidos do setor apresentando cepas fecais de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos, em investigação anterior<sup>12</sup>.

**Meios de cultura e sementeira das amostras fecais:** Foram preparadas suspensões de fezes em salina (0,85%) para cada uma das amostras obtidas, nas diluições de 1/20, 1/1000 e 1/5000. Após, 0,1 ml de cada uma das diluições foi semeado em Agar EMB (Merck), contendo 25 mg/ml de telurito de potássio (Merck) e, também, 0,1 ml em Agar EMB, contendo 8 mg/ml de gentamicina (Schering). A incubação foi realizada a 37° C por 48 h. Estimamos a ordem de grandeza das concentrações de enterobactérias fecais multirresistentes levando em consideração a contagem de colônias e a diluição do inóculo correspondente. As amostras para as quais não foi constatado crescimento de colônias bacterianas foram consideradas negativas.

**Identificação bacteriana e testes de sensibilidade aos antimicrobianos:** A identificação bacteriana foi baseada na morfologia colonial em meio de cultura, bacterioscopia de esfregaços bacterianos corados pelo método de Gram e testes bioquímicos<sup>13</sup>. As cepas bacterianas foram submetidas a testes de sensibilidade a um conjunto de antimicrobianos: ampicilina (10mg), amicacina (30mg), cefalotina (30mg), tetraciclina (30mg), gentamicina (10mg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23mg), kanamicina (30mg) e cloranfenicol (30mg), de acordo com Bauer et al.<sup>14</sup>. Duas cepas da mesma espécie foram consideradas distintas quando da ocorrência de diferentes padrões de resistência aos antimicrobianos. As cepas foram consideradas multirresistentes quando apresentaram um número de marcadores de resistência maior do que o valor da mediana determinada para o total das cepas estudadas. Na contagem do número de marcadores de resistência de cada cepa distinta, não consideramos as resistências ao telurito e à gentamicina, pois esses agentes foram utilizados na seleção das cepas resistentes. Consideramos a cepa que apresentava o maior número de marcadores de resistência aos antimicrobianos testados como sendo a *cepa de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos* (CEMA) representativa do paciente, no tocante à extensão da resistência bacteriana encontrada.

**Análise estatística:** As diferentes freqüências obtidas foram comparadas para os testes de correlação pelos testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher, segundo Levin<sup>15</sup>.

**Ensaio de transferência de plasmídios por conjugação bacteriana:** Utilizamos, seguindo investigação anterior<sup>16</sup>, culturas jovens, em caldo BHI (Merck) de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos e, em particular,

resistentes à gentamicina e sensíveis à rifampicina, (cepas doadoras potenciais) de *E.coli* K12 (cepa receptora potencial) resistente à rifampicina e sensível à gentamicina. Alíquotas de tais culturas foram semeadas em caldo BHI: um caldo de conjugação (doadora/receptora) de alta relação superfície/volume, para cada cepa doadora potencial, na proporção de uma célula bacteriana doadora para dez células receptoras. A cultura foi incubada a 37°C, sem agitação, e, após 3h, 0,1 ml de cada cultura foi semeado em agar Muller-Hinton (Merck), contendo 8mg/ml de gentamicina e 100mg/ml de rifampicina. Realizamos controles, inoculando, separadamente, culturas das cepas doadoras potenciais e da *E.coli* K12, em placas contendo o mesmo agar Muller-Hinton rifampicina-gentamicina. Os meios de cultura foram incubados até 48 h, buscando-se eventual desenvolvimento de colônias bacterianas. O desenvolvimento destas nos correspondentes aos caldos de conjugação, na ausência de crescimento nos meios de controle, conduzia-nos à realização de testes bioquímicos de identificação e antibiogramas, (como descrito acima) buscando-se caracterizar a eventual aquisição de multirresistência pela cepa de *E.coli* K12. Caso confirmássemos a transferência, submetíamos extratos da cepa de *E.coli* K12 transconjugantes à eletroforese em gel de agarose, objetivando-se a detecção de plasmídios.

*Extração de DNA plasmidial bacteriano e eletroforese em gel de agarose:* DNA plasmidial de cepas de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos foi extraído por método de lise bacteriana alcalina, submetido a eletroforese em gel de agarose (0,8%) em tampão de corrida (40 mM de TRIS-2 mM de EDTA-pH 7,9), a 10 v/cm. O gel corado pelo brometo de etídio e observado em transiluminador UV (300 nm), de acordo com Kado & Liu<sup>17</sup>.

## Resultados

As idades dos 30 recém-nascidos variaram de 0 a 30 dias, com mediana de 6 dias. Ocorreram 18 nascimentos (60%) por parto vaginal e 12 (40%) por parto cesáreo. Quinze (50%) dos 30 recém-nascidos foram submetidos a antimicrobianos, com fim terapêutico ou profilático, prévio e/ou concomitante à coleta de amostra de fezes. Para 12 (80%) das 15 crianças submetidos a antimicrobianos ocorreu a associação de oxacilina e amicacina. Nas 3 (20%) restantes administraram-se cefalotina, cefoxitina ou cloranfenicol. As infecções que motivaram a terapêutica nos 15 recém nascidos foram quadros de sepsis em 7 (46,7%); e nos demais (53,3%), quadros de pneumonia, impetigo, conjuntivite ou onfalite. Oito recém-nascidos (26,6%) receberam leite artificial, 3 (10%) não haviam, ainda, recebido alimentação enteral. Houve uso terapêutico de antimicrobianos, prévio à coleta de fezes, em 15 (50%) dos casos (Tabela 1). Obtivemos o crescimento de colônias de enterobactérias a partir de amostras de 22 dos 30 recém-nascidos (73,3%) em pelo menos um dos dois meios de cultura empregados, avaliadas, posteriormente, quanto ao

perfil de sensibilidade a antimicrobianos e ao, eventual, caráter de multirresistência (Tabela 2). A partir das fezes de 22 recém-nascidos, para os quais houve algum crescimento em meio seletivo (39%), isolaram-se 56 cepas com mais de três marcadores de resistência a antimicrobianos (excluindo-se aquele para o agente seletivo do meio de cultura), sendo que dentre estas, 26 cepas (46%) apresentaram padrões únicos de resistência. Entre os germes isolados houve marcante predomínio de cepas de *Klebsiella pneumoniae* (38 (68%) das 56 distintas cepas isoladas), enquanto para as outras espécies de enterobactérias isoladas, as freqüências foram relativamente baixas (Tabela 3).

Em 8 (27%) dos recém-nascidos, não foram isoladas quaisquer cepas de enterobactérias fecais resistentes. Para 17 dos recém-nascidos (63%), foram isoladas de 1 a 3 cepas de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos. Para 5 dos recém-nascidos (17%), isolamos 4 a 6 cepas de diferentes espécies ou de mesma espécie, com diferentes padrões de sensibilidade a antimicrobianos. A ordem de grandeza mais freqüente (moda) para as estimativas de concentração de bactérias resistentes nas fezes foi de  $10^7$  cols/g de fezes. Encontramos o valor 3 para a mediana da distribuição por número de marcadores de resistência do total de cepas distintas. Dessa forma, cepas apresentando 4 ou mais marcadores de resistência foram consideradas multirresistentes aos antimicrobianos testados. Doze das 16 cepas-índice (cepa isolada, com o maior número de marcadores de resistência) (75%) relativas ao meio contendo gentamicina foram categorizadas como multirresistentes (média de número de marcadores=4,8) em comparação com 6 das 20 cepas-índice (30%) relativas ao meio contendo telurito de potássio (média de número de marcadores=2,8), sendo a diferença de freqüências estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Em um total de 14 dos 30 recém-nascidos estudados isolamos a partir de pelo menos um dos meios seletivos cepas categorizadas como multirresistentes (Tabela 3).

Empreendemos análises univariadas de correlação da multirresistência detectada com diversos fatores como peso ao nascer, uso terapêutico de antimicrobianos, permanência no hospital (até a obtenção da amostra fecal), tipo de parto e tipo de aleitamento. Pudemos relacionar o isolamento de cepa fecal de enterobactéria multirresistente a antimicrobianos com a utilização prévia de antimicrobianos ( $p < 0,05$ ), mas não com a permanência prévia mais prolongada no hospital ( $> 6$  dias) ( $p > 0,05$ ). Não constatamos relação entre a presença da multirresistência fecal com o tipo de parto realizado ( $p = 0,458$ ; teste Exato de Fisher), com o tipo de aleitamento ( $p = 0,181$ ; teste Exato de Fisher) ou com o peso inferior a 2500g ( $p > 0,05$ ). Entretanto, considerando-se a ocorrência de aleitamento artificial (acompanhado ou não de aleitamento materno), o uso de antimicrobianos, o baixo peso ao nascer ( $< 2500$ g) e a permanência no hospital por 7 dias ou mais, pudemos correlacionar a presença de 3 ou 4 desses fatores de risco,

**Tabela 1** - Caracterização de variáveis clínico-epidemiológicas relativas a recém-nascidos incluídos no estudo de detecção de cepas fecais de enterobactérias resistentes no HUPE-UERJ (1991)

Caso Nº	Tempo no Hospital (dias)	Tipo de Parto*	Tipo de Aleitamento†	Antibioticoterapia‡	Peso(g)
09	2	VG	AT	S	3100
01	10	VG	AT	S	1800§
04	14	CS	AT	S	1640
18	8	CS	AB	S	3630
10 17	CS	AB	S	1900	
16	8	VG	AT	S	3280
20	30	VG	AT	S	1520
22	24	CS	AB	N	1800
19	8	VG	MT	S	780
24	5	VG	AB	S	3210
15	3	CS	AB	N	3140
32	19	CS	AB	S	2450
08	6	VG	MT	S	3390
02	17	VG	AB	S	2630
17	2	CS	ZR	S	3240
23	9	CS	AB	S	2310
21	2	VG	AT	S	3160
06	1	VG	MT	N	3240
31	1	CS	AT	N	2750
27	4	VG	AB	N	2790
26	9	CS	AB	N	3350
25	7	VG	MT	N	3080
03	1	CS	AT	N	1750
12	3	VG	MT	N	2880
30	0	VG	ZR	N	2710
34	8	CS	AB	N	3060
07	2	VG	AB	N	2960
11	10	VG	MT	N	3070
35	1	VG	AB	N	3560
05	1	VG	ZR	N	3040

\* VG= vaginal; CS= cesáreo  
‡ S = sim; N = não

† AT= artificial; AB= materno e artificial; MT= materno; ZR=dieta zero  
§ pesos inferiores a 2500g em destaque

tanto com o isolamento de CEMA ( $p < 0,02$ ), quanto com as maiores concentrações de cepas de enterobactérias resistentes nas fezes ( $\geq 10^7$  cepas/g de fezes) ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, constatamos que as proporções de recém-nascidos apresentando CEMA, aumentavam com a presença de maiores números de fatores de risco para colonização intestinal (Tabela 4).

Constatamos que a utilização de antimicrobianos nos recém-nascidos estava associada à ocorrência de cepas intestinais multirresistentes ( $p < 0,01$ ). Observamos que todos os recém-nascidos que utilizaram amicacina apresentaram enterobactérias resistentes a esse antimicrobiano nas fezes ( $p < 0,001$ ).

Verificamos, por ensaios de transferência de plasmídios por conjugação bacteriana, que 8 de 9 cepas de enterobactérias multirresistentes puderam transferir os

marcadores de resistência a antimicrobianos para a cepa de *Escherichia coli* utilizada como receptora. Para cada uma dessas 8 cepas pudemos detectar, por eletroforese em gel de agarose, plasmídio único de alto peso molecular na cepa doadora e na cepa de *E.coli* receptora correspondente.

## Discussão

A colonização de recém-nascidos pode se constituir em importante fator de risco para infecções, além de poder ser considerada como um importante modelo para a avaliação da colonização do intestino, de outras mucosas e da pele, que muito precocemente ocorrem ao longo da hospitalização. Podemos considerar que o ambiente intestinal do recém-nascido revela a enorme pressão de micróbios hospitalares no sentido da colonização por conta da natu-

**Tabela 2** - Isolamento de cepas bacterianas de fezes de recém-nascidos em meios de cultura contendo gentamicina (8mg/ml) ou telurito de potássio (25 mg/ml). HUPE- UERJ (1991)

Caso Nº	Maior nº de Gentam.*	Marcadores Telurito†	Caráter Multirresis.‡	Nº Cepas Distintas§	Log Conc. Bact/g Fezes£
09	6	-&	S	1	7
01	-	7	S	1	7
04	7	2	S	2	5
18	6	5	S	4	8
10	6	5	S	3	7
16	6	4	S	2	7
20	-	6	S	1	6
22	6	1	S	6	6
19	5	-	S	1	8
24	5	3	S	5	7
15	6	1	S	3	7
32	4	4	S	4	7
08	3	3	N	2	7
02	3	3	N	3	7
17	4	2	S	2	7
23	3	2	N	3	7
21	4	2	S	4	6
06	3	2	N	2	4
31	-	2	N	3	5
27	-	1	N	2	6
26	-	1	N	1	2
25	-	0	N	1	4
03	-	0	N	0	0
12	-	-	N	0	0
30	-	-	N	0	0
34	-	-	N	0	0
07	-	-	N	0	0
11	-	-	N	0	0
35	-	-	N	0	0
05	-	-	N	0	0

\* cepa com o maior número de marcadores de resistência no agar contendo 8 µg/ml de gentamicina

† cepa com o maior número de marcadores de resistência no agar contendo 25 µg/ml de telurito de potássio

‡ cepa isolada em um ou ambos meios seletivos apresentando 4 ou mais marcadores de resistência

§ foram consideradas distintas as cepas bacterianas de gêneros/espécies diferentes e/ou com padrões de resistência diferentes

£ média das concentrações bacterianas, quando do crescimento nos dois meios seletivos

& ausência de crescimento

ral imaturidade de mecanismos de defesa específicos e inespecíficos (eventualmente, mais marcada pela concorrência de complicações)<sup>5,18</sup>. Segundo Yoshioka et al.<sup>19</sup> o número total de bactérias por grama de fezes varia da ordem de  $10^9$  (em recém-nascido com 1 dia de vida) a  $10^{11}$  (em recém-nascido com 1 mês de vida). No presente estudo, as ordens de grandeza dos números de cepas de enterobactérias resistentes variaram de  $10^2$  a  $10^8$ , com moda de  $10^7$ , o que permite considerá-las um contingente minoritário das cepas intestinais, mas com um provável papel nos fenômenos de disseminação de resistência a antimicrobianos no ambiente hospitalar por meio de trans-

ferência de elementos genéticos e expansão de populações bacterianas no curso de antibioticoterapia. A própria microbiota intestinal normal atua como uma importante barreira à colonização por microrganismo potencialmente patogênicos e pelo fato de estar, no recém-nascido, em acelerado processo fisiológico de constituição, tende a refletir o aporte determinado pelo meio que em condições naturais é em grande medida determinado pela carga microbiana materna. É interessante considerar que quando, de fato, é essa (a microbiota materna) a determinante do processo de colonização, a imunidade passivamente adquirida confere defesas importantes para a ameaça de

**Tabela 3** - Distribuição das freqüências das cepas isoladas das fezes de recém-nascidos de acordo com a espécie bacteriana. HUPE-UERJ (1991)

Espécie bacteriana	Cepas isoladas nº (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38 (68)
<i>Serratia marcescens</i>	6 (11)
<i>Escherichia coli</i>	3 (5)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3 (5)
<i>Proteus mirabilis</i>	2 (4)
<i>Proteus vulgaris</i>	1 (2)
Enterobactéria não identificada	3 (5)
<b>Total</b>	<b>56 (100%)</b>

\* em agar EMB contendo 25µg/ml de telurito de potássio ou 8µg/ml de gentamicina

infecções endógenas por microrganismos previamente reconhecidos pelo sistema imunológico materno. No ambiente hospitalar a colonização tende a se dar incluindo cepas hospitalares veiculadas pelo pessoal de saúde e por diversos procedimentos que envolvem riscos. Essa colonização anômala pode ser favorecida por alimentação artificial, uso de antimicrobianos, alterações teciduais locais e/ou sistêmicas<sup>6</sup>.

**Tabela 4** - Distribuição de freqüências e proporções de recém-nascidos apresentando cepas intestinais de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos pelos números de fatores de risco para colonização considerados. HUPE-UERJ (1991)

Número de fatores de risco*	Proporções de cepas multirresistentes fecais† nº / total (%)
0	0 / 4 (0)
1	2 / 8 (25)
2	3 / 7 (43)
3	4 / 7 (80)
4	5 / 6 (83)
<b>Total</b>	<b>14 / 30 (100)</b>

\* Fatores de risco: uso de antimicrobianos, hospitalização por mais de 6 dias, aleitamento artificial (acompanhado, ou não, do materno) e baixo peso (<2500g)

† Resistência a 4 ou mais dos antimicrobianos: ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, amicacina e cefalotina

Neste estudo procuramos avaliar a aquisição de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos no intestino de recém-nascidos, empregando meios seletivos de cultura bacteriana, contendo telurito de potássio ou gentamicina. O telurito de potássio, já utilizado em investigação anterior<sup>12</sup>, mostrou-se menos adequado à detecção de cepas resistentes que o meio contendo gentamicina, tendo-se em conta que as cepas isoladas no meio contendo gentamicina apresentaram caráter de multirresistência mais marcante.

Um dado que consideramos relevante é o predomínio de cepas de *Klebsiella pneumoniae* como espécie resistente isolada (38/56). Segundo Lundquist et al.<sup>20</sup>, as *Escherichia coli* predominam como espécie de enterobactérias fecais, entretanto, nossa investigação referiu-se, em particular, à detecção das cepas de enterobactérias resistentes a antimicrobianos. De fato, Montegomerie et al.<sup>21</sup> e Roset & Schreir<sup>22</sup> descreveram um significativo aumento da incidência de *Klebsiella pneumoniae* no intestino, a partir da utilização de alguns antimicrobianos. Para Sakata et al.<sup>8</sup>, a utilização de antimicrobianos, em crianças, levava à substituição de *Escherichia coli* por *Klebsiella pneumoniae* no intestino. De acordo com Jones<sup>23</sup>, a resistência a antimicrobianos, associada a plasmídios, tende a aparecer, inicialmente, em cepas de *Klebsiella pneumoniae* que pode ser considerada um reservatório de genes de resistência, podendo transferi-los para outras espécies de enterobactérias e para outros grupos bacterianos. Um dado relevante para a epidemiologia da multirresistência entre enterobactérias, no Berçário em foco, foi a constatação da competência de enterobactérias na transferência por conjugação *in vitro* de plasmídios de altos pesos moleculares determinando os perfis de multirresistência das cepas de *E.coli* receptoras (transconjugantes). Tal transferência poderia ocorrer *in vivo* entre diferentes constituintes da microbiota intestinal, favorecendo a disseminação da multirresistência no ambiente em questão, o que, eventualmente, se relaciona a situações endêmicas ou epidêmicas de multirresistência bacteriana associada a plasmídios. De fato, encontramos padrões de resistência (antibiótipos) compartilhados por diferentes espécimes de enterobactérias, o que, ao lado da comprovação da capacidade de transferência de multirresistência plasmidial por 8 das 9 cepas testadas, indica uma, provavelmente, relevante ocorrência da disseminação da resistência entre cepas no Berçário estudado.

No Serviço onde foi realizado o estudo, a amicacina passou a ser utilizada (em associação à oxacilina ou à ampicilina) como 1ª escolha para o tratamento de infecções, em substituição à gentamicina. Tal prática se deveu à resistência à gentamicina dos agentes bacterianos de infecção isolados dos pacientes do Serviço. A utilização da amicacina a partir dos anos anteriores ao trabalho favoreceu, provavelmente, a seleção e a manutenção das cepas resistentes a esse antimicrobiano no Berçário<sup>23</sup>.

O leite materno pode ser considerado muito importante na proteção do recém-nascido contra infecções<sup>19,24</sup>. Entretanto, não encontramos associação entre o tipo de aleitamento com a presença de germes multirresistentes no intestino de recém-nascidos. Por outro lado, o aleitamento artificial introduz riscos de contaminação do recém-nascido, por conta de preparo inadequado, favorecendo a ocorrência de infecções<sup>25</sup>. Consideramos, no nosso estudo, a impossibilidade de realizar seguras análises univariáveis de correlação entre a colonização e os fatores de risco considerados, tendo em vista a impossibilidade de, pelo pequeno tamanho da amostra de casos, controlar para a análise de cada fator, os demais fatores. Entretanto, foi possível revelar o provável papel da alimentação artificial e do baixo peso ao nascer, no contexto da avaliação de risco, considerando-se fatores associados. Quando analisamos esses fatores em conjunto, encontramos a associação deles com a presença de enterobactérias multirresistentes no intestino, assim como às maiores concentrações de cepas intestinais multirresistentes. Concordantemente, encontramos proporções progressivamente maiores de recém-nascidos apresentando CEMA, acompanhando o aumento no número de fatores de risco para colonização estudados. A associação desse conjunto de fatores de risco para o tipo de colonização em questão pode ser relacionada à reconhecida associação desses mesmos fatores na predição do risco de infecções em recém-nascidos. Consideramos, de acordo com outros autores, que a ocorrência de colonização pode se dar no âmbito da gênese do processo infeccioso, precedendo-o<sup>26</sup>.

Consideramos que o estudo, mesmo sendo relativo ao processo de colonização neonatal no início da década em curso, seja relevante como avaliação preliminar indicativa do problema no nosso ambiente. Levamos em conta que, nos três últimos anos (95, 96 e 97), cerca de 30% dos isolamentos, a partir de hemoculturas e secreções diversas da UTI Neonatal do HUPE-UERJ, corresponderam a enterobactérias (dados da CCIH/HUPE-UERJ) e que as associações de ampicilina (ou oxacilina) e amicacina (ou gentamicina) mantêm-se como 1ª escolha de terapêutica empírica de infecções.

O monitoramento periódico da colonização intestinal dos recém-nascidos por culturas em meios seletivos (como o Agar EMB-gentamicina) pode constituir-se em subsídio importante para o estabelecimento de medidas efetivas de controle de colonização/infecção nosocomial. Na presente investigação pudemos, com os meios de cultura seletivos, correlacionar o isolamento de enterobactérias fecais multirresistentes com vários fatores de risco para infecção, contribuindo de forma indireta para a compreensão da colonização como etapa prévia nos processos de infecção, em particular para a situação em foco. Propomos algumas medidas no âmbito de unidades neonatais, concordando com outros autores, visando à diminuição de colonização (e dessa forma, diminuindo também os riscos de infecção) por germes multirresistentes, tais como isolamento em casos de infecções comprovadas por germes multirresis-

tentes, alojamento conjunto, controle mais efetivo dos processos de esterilização/desinfecção de equipamentos instrumentos e utensílios, correta e oportuna lavagem de mãos e controle do uso de antimicrobianos.

### Referências bibliográficas

1. Perl TM. Surveillance, reporting, and use of computers. In: Wenzel RP, ed. Prevention and control of nosocomial infections. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993.p.139-76.
2. Speller DCE. Hospital-associated infections. In: Parker MT, Collier LH. Topley & Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. v.3. 8ª ed. London: Edward Arnold; 1990:141-71.
3. Pfaller MA. Microbiology: the role of the clinical laboratory in hospital epidemiology and infection control. In: Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993. p.385-405.
4. Kussano EJ, Grinbaum RS. Estafilococos coagulase-negativa e enterococos. In: Rodrigues EAC. Infecções hospitalares. prevenção e controle. São Paulo: Sarvier; 1997.p.599-608.
5. Donowitz LG. Infection in the newborn. In: Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993.p.796-811.
6. Moore DL. Nosocomial infections in newborn nurseries and neonatal intensive care units. In: Mayhall CG. Hospital epidemiology and infection control. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996.p.535-64.
7. Montanaro D, Grasso GM, Annino I, De Ruggiero N, Scarcella A, Schiopa F. Epidemiological and bacteriological investigation of *Serratia mercrescens* epidemic in a nursery and a neonatal intensive care unit. J Hyg Camb 1984; 93:67-78.
8. Sakata H, Fujita K, Yoshioka H. The effect of antimicrobial agents on fecal flora of children. Antimicrob Agents Chemother 1968;29:225-9.
9. Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterström R. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. Pediatr Infect Dis 1986;5:533-39.
10. Rubens GE, McNeil WF, Farrar W. Evolution of multiple antibiotic-resistance plasmids mediated by transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequences. J Bacteriol 1979; 140:713-19.
11. Tomalsky ME, Chamorro RM, Crosa JH, Marini PM. Tn1331, a novel multiresistance transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1988;32:1416-20.
12. Mello SAC, Castro EAR, Pereira JAA, Suassuna I. Use of a selective medium with potassium tellurite to follow intestinal colonization of hospitalized patients by drug-resistance Enterobacteriaceae. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993;88:135-40.
13. Farmer III JJ. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Murray PR. Manual of clinical microbiology. Washington: AASM Press; 1995.p.438-49.
14. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turk M. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45:493-96.

15. Levin J. Estatística Aplicada a Ciências Humanas. 2ªed. São Paulo: Harper & Row; 1987.p.194-230.
16. Pereira JAA. Marcadores epidemiológicos para *Klebsiella pneumoniae* no ambiente hospitalar. [Tese de Mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1982. p.16-8.
17. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981;145:1365-73.
18. Madden NP, Levinsky RJ, Bayston R, Harvey B, Turner MW, Spitz L. Surgery, sepsis, and nonspecific immune function in neonates. J Pediatr Surg 1989;24:562-66.
19. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. Pediatrics 1983;72:317-21.
20. Lundequist B, Nord CE, Winberg J. The composition of the fecal microflora and bottle fed infants from birth to eight weeks. Acta Paediatr 1985;74:45-51.
21. Montegomerie JZ, Doak PB, Taylor DEM, North JDK. *Klebsiella* in fecal flora of renal-transplant patients. Lancet 1970;787-92.
22. Roset HD, Schreir J. The effect of hospitalization and antibiotic therapy on gram-negative fecal flora. Am J Med Sci 1968; 255:228-35.
23. Jones RN. The current and future impact of antimicrobial resistance among nosocomial bacterial pathogens. Diagn Microbiol Infect Dis 1992;15:3-10.
24. Andrade GMQ. Flora normal do organismo. In: Tonelli E. Doenças infecciosas na infância.v.1.Rio de Janeiro: MEDSI; 1987.p.85-97.
25. Narayanan I, Gupta J. Human milk and neonatal infections. Acta Paediatr Scand 1989;351:126-30.
26. Montanaro D, Grasso GM, Annino I, De Ruggiero N, Scarcella A, Schioppa F. Epidemiological and bacteriological investigation of *Serratia marcescens* epidemic in a nursery and in a neonatal intensive care unit. J Hyg Camb 1984; 93: 67-78.

Endereço para correspondência:

Prof. José Luiz Bandeira Duarte

Dep. Pediatria - Av. 28 de setembro, 87 - Vila Isabel

CEP 20551-030 - Rio de Janeiro, RJ

Tel.: (021) 587.6380 - Fax: (021) 587.6476