UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE MEDICINA
FUNDADA EM 1963

MESTRADO EM BIOCIÊNCIAS

Perfil fenotípico e molecular de bactérias Gram-negativas isoladas em hemoculturas e sua relação com os desfechos clínicos em pacientes internados na unidade de cuidados intensivos pediátricos do Hospital Central de Maputo entre Janeiro e Dezembro de 2023

Marília Violeta Sufiana Mussagy

Maputo, 21 de Outubro de 2026

MESTRADO EM BIOCIÊNCIAS

Perfil fenotípico e molecular de bactérias Gram-negativas isoladas em hemoculturas e sua relação com os desfechos clínicos em pacientes internados na unidade de cuidados intensivos pediátricos do Hospital Central de Maputo entre Janeiro e Dezembro de 2023

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências pela Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane

Nome do estudante: Marília Violeta Sufiana Mussagy

Supervisor: Prof. Doutor José Sumbana, BSc., MSc., PhD

Co-Supervisor: Profª. Doutora Alice Manjate BSc., MSc, PhD

Declaração de originalidade do projecto

Eu, Marília Violeta Sufiana Mussagy, declaro por minha honra que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção do grau ou num outro âmbito e que constitui o resultado do meu labor individual. Esta dissertação é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biociências, da Universidade Eduardo Mondlane.

Marília Violeta Sufiana Mussagy

Maputo, 03 de Agosto de 2026

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Haidar Sufiana e Olívia Chiziane, que sempre me apoiaram nos estudos. Ao meu esposo Nabiil Macharque pela paciência, e incentivos constantes ao longo desta jornada acadêmica. Aos meus filhos Kámil Macharque e Kahiil Macharque cuja alegria e curiosidade me inspiram todos os dias. Que este trabalho seja um símbolo do meu amor por eles e pelo desejo de sempre ser um exemplo de dedicação e perseverança.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter permitido que eu chegasse até aqui com saúde, ele foi a minha esperança em todas as dificuldades que enfrentei.

Ao meu supervisor Prof. Doutor José Sumbana, o meu muito obrigado pelos ensinamentos, orientação e pela paciência que teve comigo para a realização deste trabalho, palavras não são suficientes para expressar tamanha gratidão, e a minha Co-supervisora Profª. Dra. Alice Manjate o meu muito obrigado pelo apoio e suporte durante esta trajetória.

Em especial, agradeço aos meus pais Haidar Sufiana e Olívia Chiziane que com todo amor e carinho ensinaram-me que o sucesso se encontra na busca do conhecimento.

Ao meu esposo Nabiil Macharque por seu amor, paciência e apoio incondicional ao longo desta jornada. Aos meus filhos Kámil e Kahiil, cuja sua presença na minha vida é uma fonte constante de inspiração. Aos meus irmãos Anwar Sufiana e Helder Sufiana, obrigada.

A minha imensa gratidão à coordenação do Projecto ONCOINVEST pela bolsa de estudos para o meu curso de Mestrado em Biociências da FAMED-UEM.

À equipa dos Cuidados Intensivos Pediátricos do Hospital Central de Maputo, em especial a Dra. Stella Langa que nos forneceu apoio para a realização deste estudo.

Ao Centro de Biotecnologia da Faculdade de Veterinária, em especial à Dra. Nídia pelo apoio dado, obrigada.

À direção da Faculdade de Medicina em especial ao Professor Catedrático Doutor Jahit Sacarlal e à Profª. Doutora Tufária Mussa pelo apoio nesta jornada académica. Ao chefe do Departamento de Microbiologia Dr. Alfeu Passanduca pelo apoio em todas as fases do meu trabalho.

A Coordenação do Mestrado em Biociências, representada pelo Doutor Venceslau Muiuane, atual coordenador, e à Professora Doutora Carla Carrilho, que coordenou este mestrado numa fase anterior, pelo acompanhamento, disponibilidade e organização ao longo de todo o percurso. À Licenciada Ema Nhantumbo, pelo suporte administrativo e logístico fundamental em cada etapa. Muito obrigada.

Expresso a minha sincera gratidão à Dra. Elisa Taviani pelo apoio técnico prestado durante o desenvolvimento desta dissertação, especialmente na montagem das sequências moleculares. A sua disponibilidade e colaboração foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos Mestres: Ventura Relvas, Darlenne Kenga, Arsénio Muchongo, Fabião Mausse e Licenciados: Samuel Simbine, muito obrigada por todos os ensinamentos. Ao Senhor Tiago, Vitorino e Bernardo pelo apoio na disponibilização do material de Laboratório, estou imensamente grata!

Aos meus colegas Elias Manjate, Zubaida Chiau, Ivete Samuel, Evanilde Abreu, Esménia João e Marcília Chirindzane, pelo apoio nos momentos difíceis e pela força que me deram durante a conclusão dos meus estudos.

Índice

Declaração de originalidade do projecto i

Dedicatória ii

Agradecimentos iii

Lista de tabelas ix

Lista de figuras ix

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos x

Resumo xi

Abstract xiv

1. Motivação 1

2. Objectivos 2

2.1. Geral 2

2.2. Específicos 2

3. Contribuição 3

4. Problema 4

4.1. Questões de pesquisa 6

5. Revisão bibliográfica 7

5.1. Características gerais das bactérias Gram-negativas e infecções invasivas 7

5.2.1. *Klebsiella pneumoniae* 8

5.2.2. *Escherichia coli* 8

5.2.3. *Enterobacter* spp. 9

5.2.4. *Pseudomonas aeruginosa* 10

5.2.5. *Acinetobacter baumannii* 12

5.3. Mecanismos de resistência de bactérias Gram-negativas 13

5.3.1. Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) 13

5.3.2. Carbapenemases 16

5.3.3. Modificação do alvo 17
5.3.4. Alteração da permeabilidade 17
5.3.5. Bombas de efluxo 18
5.4. Factores de virulência em bactérias Gram-negativas 18
5.5. Opções terapêuticas para as infecções invasivas causadas por bactérias Gram-negativas 19
6. Enquadramento conceptual 20
7. Metodologia 22
7.1. Tipo/Desenho do estudo 22
7.2. Local do Estudo 22
7.3. Período do estudo 23
7.4. População do estudo 23
7.5. Critérios de inclusão e de exclusão 23
7.6. Modo de selecção das amostras, amostragem e tamanho da amostra 23
7.7. Procedimentos, técnicas e instrumentos de recolha de dados 24
7.7.1. Colheita da amostra, dados demográficos e clínicos 24
7.7.2. Procedimentos laboratoriais 24
7.7.3. Relação genótipo-fenótipo com os desfechos clínicos 29
8. Variáveis do estudo 29
9. Plano de gestão e análise de dados 30
10. Considerações éticas 30
10.1. Potenciais riscos e como foram minimizados, benefícios e confidencialidade 31
11. Resultados 32
11.1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com sépsis provenientes da UCIP-HCM entre Janeiro e Dezembro de 2023 32

11.2. Frequência de espécies de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de hemocultura provenientes da UCIP-HCM entre Janeiro e Dezembro de 2023 33

11.3. Comparação do resultado da identificação da espécie de bactérias Gram-negativas de isolados de amostras de hemocultura obtido por métodos bioquímicos com a análise genómica *in silico* 33

11.4. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de espécies de bactérias Gram-negativas 35

11.4.1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* 35

11.4.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella* spp. 35

11.4.3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Enterobacter* spp. 36

11.4.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* 37

11.4.5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* 37

11.4.6. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Cronobacter* spp. 38

11.5. Concordância entre o perfil de resistência antimicrobiana e molecular dos isolados de bactérias Gram-negativas 38

11.6. Caracterização molecular de genes de virulência em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* 41

11.7. Relação entre os desfechos clínicos dos pacientes com o perfil fenotípico e molecular 42

12. Discussão 46

12.1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com sépsis provenientes da UCIP-HCM entre Janeiro e Dezembro de 2023 46

12.2. Frequência de espécies de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de hemocultura provenientes da UCIP-HCM entre Janeiro e Dezembro de 2023 48

12.3. Comparação do resultado da identificação da espécie de bactérias Gram-negativas de isolados de amostras de hemocultura obtido por métodos bioquímicos com a análise genómica *in silico* 50

12.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias Gram-negativas.... 54

12.5. Caracterização molecular dos isolados de bactérias Gram-negativas 57

12.6. Relação entre os desfechos clínicos dos pacientes com o perfil fenotípico e molecular 65

13. Limitações do estudo 70

14. Conclusão 71

15. Recomendações 72

16. Referências bibliográficas 73

17. Anexos 95

Lista de tabelas

Tabela 1. Factores de virulência de bactérias Gram-negativas.....19

Tabela 2. Tamanho e concentrações dos halos dos antibióticos que foram testados, segundo CLSI, 2023.....27

Tabela 3. Características demográficas e clínicas dos pacientes com sépsis dos quais foram obtidos os isolados de bactérias Gram-negativas incluídos no presente estudo.....33

Tabela 4. Frequência de espécies de bactérias Gram-negativas identificadas de hemoculturas na UCIP-HCM, Janeiro e Dezembro de 2023.....34

Tabela 5. Comparação do resultado da identificação bioquímica dos isolados BGN e *in silico*.....35

Tabela 6. Caracterização molecular dos genes de virulência e sua classificação funcional em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.....43

Tabela 7. Relação entre o desfecho clínico dos pacientes e as características fenotípicas e moleculares dos isolados bacterianos.....45

Lista de figuras

Figura 1. Mapa da cidade de Maputo, mostrando a divisão administrativa e a localização do Hospital Central de Maputo (HCM) e da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Eduardo Mondlane (UEM).....23

Figura 2. Determinação do perfil de susceptibilidade a antibióticos através do método de disco-difusão.....27

Figura 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella* spp. provenientes de pacientes com sépsis internados na UCIP-HCM.....37

Figura 4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Enterobacter* spp. provenientes de pacientes com sépsis internados na UCIP-HCM.....38

Figura 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *A. baumannii* provenientes de pacientes com sépsis internados na UCIP-HCM.....38

Figura 6. Distribuição dos genes de resistência antimicrobiana entre os isolados bacterianos analisados.....41

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

%	Percentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
AmpC	β-lactamase do tipo AmpC
A. baumannii	*Acinetobacter baumannii*
ATB	Antibiótico
BGN	Bactérias Gram-negativas
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E. coli	*Escherichia coli*
ESBL	Extended-Spectrum β-Lactamases (β-lactamases de espectro estendido)
FAMED	Faculdade de Medicina
HCM	Hospital Central de Maputo
ICS	Infecção da corrente sanguínea
INS	Instituto Nacional de Saúde
K. pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Multidrug-resistant (Multirresistência)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
ST	*Sequence Type* (Tipo de sequência)
UCIP	Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos

Resumo

Introdução: A crescente prevalência de bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos fármacos representa um sério desafio à saúde pública, com impacto particularmente grave em unidades de cuidados intensivos, devido à elevada morbimortalidade. Espécies como *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus spp., Enterobacter spp., Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* destacam-se pela crescente multirresistência. Em Moçambique, os dados sobre sépsis pediátrica causada por estas bactérias na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do Hospital Central de Maputo são escassos, justificando a realização deste estudo.

Metodologia: Foi conduzido um estudo descritivo, transversal e retrospectivo envolvendo 16 isolados de bactérias Gram-negativas obtidos de hemoculturas de doentes internados na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do Hospital Central de Maputo. Os isolados bacterianos foram obtidos de amostras de hemoculturas colhidas entre Janeiro e Dezembro de 2023 e que foram armazenados no Biobanco do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane. A identificação dos isolados bacterianos foi feita através da subcultura em Ágar MacConkey e HiCrome *Klebsiella* agar e sistema API 20E. A susceptibilidade a antimicrobianos foi determinada através do método de difusão em disco (Kirby-Bauer). A extracção de DNA genómico foi feita através do Kit QIAGEN e para a quantificação usou-se o NanoDrop. O DNA genómico foi sequenciado usando a plataforma *Illumina NextSeq platform*, 30× coverage (NGX) o *assembling* através de SPAdes 3.13.0. para um total de 11 amostras. Para a identificação de genes de resistência e virulência recorreu-se principalmente a ferramentas do Centro de Epidemiologia Genómica, como o *ResFinder* e o *VirulenceFinder* incluindo as linhagens e plasmídeos através das plataformas MLST e *PlasmidFinder* para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii*. Os desfechos clínicos dos pacientes foram analisados e relacionados com os perfis moleculares dos isolados bacterianos.

Resultados: Do total de 16 isolados incluídos no estudo, 9 (56%) foram obtidos de indivíduos do sexo masculino e 7 (44%) do sexo feminino e todos apresentaram idade < 5 anos. Observou-se maior frequência de *Klebsiella* spp. 5 (31,3%), seguida de *Enterobacter* spp. 4 (25%), *A. baumannii* 2 (12,5%) e menor frequência das espécies *E.*

coli 1 (6,3%), *P. aeruginosa* 1 (6,3%) e *Cronobacter* spp. 1 (6,3%), outras bactérias Gram-negativas 2 (12,5%). As principais linhagens (*sequence types*) identificados são: *E. coli* ST167, *K. pneumoniae* (ST231, ST37) *A. baumannii* (ST1961/ST944), *P. aeruginosa* ST357, *E. hormaechei* (ST2692, ST270) e *E. kobei* (ST125/ST1990/ST2543). *E. coli* e *P. aeruginosa* foram totalmente resistentes (100%) aos antimicrobianos testados. *Cronobacter* spp. foi resistente a todos os antimicrobianos testados, excepto à ciprofloxacina, para a qual apresentou susceptibilidade intermédia. Os isolados de *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *A. baumannii* apresentaram elevada resistência aos β-lactâmicos e ao sulfametoxazol-trimetoprim. Em *Enterobacter* spp., observou-se ainda elevada resistência às quinolonas e aos carbapenémicos, enquanto a susceptibilidade ao imipenem, aminoglicosídeos e tetraciclina foi variável (50% a 75%). Todos os 16 isolados de BGN analisados (100%) foram classificados como multidroga resistentes (MDR), de acordo com os resultados do perfil fenotípico de susceptibilidade aos antimicrobianos. Na maioria das espécies bacterianas foram identificados principalmente os genes *bla*TEM 10 (100%) seguido de *bla*NDM 7 (70%), *bla*OXA e *bla*CTX-M-15 5 (50%) e *bla*SHV 3 (30%), responsáveis pela resistência aos β-lactâmicos e carbapenémicos. Os genes de resistência coexistentes incluiram *aac(6')-Ib-cr* 5 (50%), *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id* 7 (70%); *tet(A)* 6 (60%) e *tet(D)* 1 (10%); *qnrB1* 4 (40%), *OqxA* e *OqxB* 6 (60%), *sul1* e *sul2* 7 (70%) para aminoglicosídeos, tetraciclinas, quinolonas, e sulfonamidas, respectivamente. Em *E. coli* foram detectados factores de virulência associados à adesão e colonização (*csgA, papA_F43, papC, yehB, yehC, yehD, yghJ, aslA, HRA* e *fdeC*), à aquisição de ferro (*irp2*), à evasão do sistema imunitário (*nlpI, shiB, capU, iss* e *traT*) e à citotoxicidade (*hlyE* e *astA*), incluindo os plasmídeos IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncI e IncN3. Nos isolados de *K. pneumoniae* foram identificados genes de virulência do sistema ECP (*yagY/ecpB, yagZ/ecpA, yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC* e *ykgK/ecpR*), associados à adesão e colonização, bem como genes relacionados com a aquisição de ferro (*entA, entB* e *fepC*) e o gene *ompA*, associado à invasão e evasão da resposta imunitária. Estes isolados apresentaram os plasmídeos Col(pHAD28), IncFII(K), IncR, IncFIA(pBK30683), IncFIB(K), IncFIB(K)(pCAV1099-114), IncFIB(pNDM-Mar), IncHI1B(pNDM-MAR), RepB e repFIB. Observou-se ainda diversidade de tipos capsulares, incluindo K30 e K35 em *K. pneumoniae* e K155 em *A. baumannii*, bem como diversidade de tipos do antigénio O do lipopolissacarídeo (O1αβ, O2β e O3αβ) em *K. pneumoniae* e do locus do núcleo externo do lipopolissacarídeo (OC1) em *A. baumannii*. A mortalidade foi de 56,3%,

predominando em doentes cujos isolados apresentavam perfil de multirresistência e múltiplos factores de virulência.

Conclusão: As bactérias Gram-negativas associadas à etiologia da sépsis pediátrica na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do Hospital Central de Maputo possuem factores de patogenicidade e são resistentes aos antibióticos comumente usados para o tratamento da infecções incluindo os antibióticos considerados de reserva, cujos principais determinantes são *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M-15, *bla*NDM e *bla*OXA coexistindo com os determinantes das outras classes. Estes achados evidenciam a presença de espécies bacterianas de alto risco no UCIP havendo necessidade de fortalecimento de vigilância contínua e controlo das infecções. Adicionalmente, torna-se imperativa a adopção de programas estritos de prevenção e vigilância das infecções associadas aos cuidados de saúde (*stewardship* de antimicrobianos) para optimizar o maneio terapêutico e mitigação da expansão da resistência bacteriana.

Palavras-chave: sépsis pediátrica; bactérias Gram-negativas; resistência antimicrobiana; sequenciamento do genoma completo; factores de virulência; multirresistência.

Abstract

Introduction: Resistant Gram-negative bacteria including *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* are the major concern in paediatric intensive care units because of association with sepsis, high morbidity and mortality and the data of antimicrobial surveillance from ICU are limited in HCM. This study therefore aimed to characterise the invasive Gram-negative bacteria isolated from children with sepsis admitted to the Paediatric Intensive Care Unit at Maputo Central Hospital, as well as to describe their associated clinical outcomes.

Methods: This study employed a descriptive, cross-sectional, and retrospective design, encompassing 16 Gram-negative bacterial isolates recovered from blood cultures of patients admitted to the Paediatric Intensive Care Unit of Maputo Central Hospital. The clinical specimens were obtained between January and December 2023 and were subsequently preserved in the Biobank of the Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine, Eduardo Mondlane University. Species identification was accomplished through subculturing on MacConkey agar and HiCrome *Klebsiella* agar, with confirmation achieved via the API 20E biochemical system. Antimicrobial susceptibility was assessed using the disc diffusion technique. Genomic DNA was extracted with the QIAGEN kit, and its concentration was determined by NanoDrop spectrophotometry. Whole-genome sequencing was performed on 11 isolates using the Illumina NextSeq platform at 30× coverage, with de novo assembly carried out using SPAdes 3.13.0. The detection of resistance and virulence determinants relied primarily on the Centre for Genomic Epidemiology tools, namely ResFinder and VirulenceFinder. Sequence types and plasmid replicons were identified through MLST and PlasmidFinder for *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *A. baumannii*. Finally, patient clinical outcomes were examined in relation to the molecular characteristics of the bacterial isolates.

Results: Of the total of 16 isolates included in the study, 9 (56%) were obtained from male individuals and 7 (44%) from female individuals, and all were aged < 5 years. A higher frequency of *Klebsiella* spp. 5 (31.3%) was observed, followed by *Enterobacter* spp. 4 (25%), *A. baumannii* 2 (12.5%) and a lower frequency of the species *E. coli* 1 (6.3%), *P. aeruginosa* 1 (6.3%) and *Cronobacter* spp. 1 (6.3%), other Gram-negative

bacteria 2 (12.5%). The main sequence types identified were: *E. coli* ST167, *K. pneumoniae* (ST231, ST37), *A. baumannii* (ST1961/ST944), *P. aeruginosa* ST357, *E. hormaechei* (ST2692, ST270) and *E. kobei* (ST125/ST1990/ST2543). *E. coli* and *P. aeruginosa* were completely resistant (100%) to the antimicrobials tested. *Cronobacter* spp. showed resistance to all antimicrobials tested, except ciprofloxacin, to which it showed intermediate susceptibility. The isolates of *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. and *A. baumannii* showed high resistance to β-lactams and sulfamethoxazole-trimethoprim. In *Enterobacter* spp., high resistance to quinolones and carbapenems was also observed, whereas susceptibility to imipenem, aminoglycosides and tetracycline was variable (50% to 75%). All 16 Gram-negative bacterial (GNB) isolates analysed (100%) were classified as multidrug-resistant (MDR), based on the results of phenotypic antimicrobial susceptibility testing. Most bacterial species showed the genes *bla*TEM 10 (100%), followed by *bla*NDM 7 (70%), *bla*OXA and *bla*CTX-M-15 5 (50%) and *bla*SHV 3 (30%), responsible for resistance to β-lactams and carbapenems, were mainly identified. Coexisting resistance determinants included *aac(6')-Ib-cr* 5 (50%), *aph(3'')-Ib* and *aph(6)-Id* 7 (70%); *tet(A)* 6 (60%) and *tet(D)* 1 (10%); *qnrB1*4 (40%), *OqxA* and *OqxB* 6 (60%), *sul1* and *sul2* 7 (70%) for aminoglycosides, tetracyclines, quinolones, and sulphonamides, respectively. *E. coli*, showed virulence factors associated with adhesion and colonisation (*csgA, papA_F43, papC, yehB, yehC, yehD, yghJ, aslA, HRA* and *fdeC*), iron acquisition (*irp2*), immune system evasion (*nlpI, shiB, capU, iss* and *traT*) and cytotoxicity (*hlyE* and *astA*) were detected, including the plasmids IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncI and IncN3. Virulence genes of the ECP system (*yagY/ecpB, yagZ/ecpA, yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC* and *ykgK/ecpR*), associated with adhesion and colonisation, as well as genes related to iron acquisition (*entA, entB* and *fepC*) and the *ompA* gene, associated with invasion and evasion of the immune response, were identified in *K. pneumoniae* isolates. These isolates harboured the plasmids Col(pHAD28), IncFII(K), IncR, IncFIA(pBK30683), IncFIB(K), IncFIB(K)(pCAV1099-114), IncFIB(pNDM-Mar), IncHI1B(pNDM-MAR), RepB and repFIB. The diversity of capsular types was also observed, including K30 and K35 in *K. pneumoniae* and K155 in *A. baumannii*, as well as diversity of lipopolysaccharide O antigen types (O1αβ, O2β and O3αβ) in *K. pneumoniae* and of the lipopolysaccharide outer core locus (OC1) in *A. baumannii*. Mortality rate was 56.3%, mainly in patients whose isolates exhibited a multidrug-resistant profile and multiple virulence factors.

Conclusion: The Gram-negative bacteria implicated in paediatric sepsis cases at the Paediatric Intensive Care Unit of Maputo Central Hospital harbour virulence determinants and exhibit resistance to antimicrobial agents routinely employed in clinical practice, including those reserved as last-line therapies. The principal genetic drivers underlying β-lactam resistance are *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M-15, *bla*NDM, and *bla*OXA, frequently accompanied by determinants conferring resistance to other antibiotic classes. These observations underscore the circulation of high-risk bacterial clones within the PICU setting, emphasising the critical importance of reinforced ongoing surveillance and robust infection prevention strategies. Furthermore, the establishment of stringent antimicrobial stewardship programmes is essential to refine therapeutic decision-making and curb the further dissemination of drug-resistant bacteria.

Keywords: pediatric sepsis; Gram-negative bacteria; antimicrobial resistance; whole-genome sequencing; virulence factors; multidrug resistance.

1. Motivação

A resistência antimicrobiana constitui um importante problema de saúde pública, particularmente no contexto hospitalar, onde as infecções causadas por bactérias Gram-negativas (BGN) resistentes podem limitar as opções terapêuticas e contribuir para desfechos clínicos desfavoráveis (WHO, 2024). Este problema assume particular relevância nas Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP), onde o uso frequente de antimicrobianos e a complexidade dos cuidados prestados a crianças criticamente doentes podem favorecer a emergência e a disseminação da resistência antimicrobiana (Willems *et al*., 2021).

No Hospital Central de Maputo (HCM), estudos anteriores têm reportado a ocorrência de infecções invasivas causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae*, que apresentam elevados níveis de resistência (Mahaluça, 2019; Sumbana, 2019). Foram também reportados casos de mortalidade associados a infecções bacterianas resistentes, reforçando a necessidade de vigilância contínua destas infecções, particularmente em contextos de cuidados intensivos (Massinga *et al*., 2021). Apesar destes achados, os estudos disponíveis no HCM têm-se concentrado sobretudo na identificação e caracterização de bactérias resistentes aos antimicrobianos, permanecendo limitada a informação integrada sobre os perfis fenotípicos e moleculares das BGN associadas a infecções invasivas especificamente na UCIP e sobre a sua relação com os desfechos clínicos dos pacientes (Mahaluça, 2019; Sumbana, 2019).

No meu estudo de graduação, 100% dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos de hemoculturas em diferentes departamentos do HCM apresentaram resistência aos antibióticos β-lactâmicos e 60% aos carbapenémicos, tendo sido identificados os determinantes de resistência *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CTX-M (Sufiana, 2020). Adicionalmente, a maioria das amostras de pacientes com sépsis era proveniente do Departamento de Pediatria (Sufiana, 2020).

Neste contexto, torna-se necessária a realização de estudos que permitam caracterizar, de forma integrada, as BGN isoladas de hemoculturas na UCIP-HCM, considerando os seus perfis fenotípicos e moleculares de resistência e a sua relação com os desfechos clínicos dos pacientes.

2. Objectivos

2.1. Geral

- Analisar o perfil fenotípico e molecular de bactérias Gram-negativas isoladas em hemoculturas e sua relação com os desfechos clínicos em pacientes internados na unidade de cuidados intensivos pediátricos do Hospital Central de Maputo entre Janeiro e Dezembro de 2023.

2.2. Específicos

- Descrever as características demográficas e clínicas em pacientes com sépsis;
- Comparar o resultado da identificação das espécies de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de hemoculturas obtido por métodos bioquímicos (API 20E) com a análise genómica *in silico*;
- Determinar o perfil de sensibilidade de espécies de bactérias Gram-negativas aos antibióticos;
- Identificar os genes de resistência aos antibióticos de espécies de bactérias Gram-negativas;
- Identificar os genes de virulência em espécies de bactérias Gram-negativas;
- Relacionar os desfechos clínicos em pacientes com o perfil de virulência e resistência dos isolados de bactérias Gram-negativas.

3. Contribuição

A caracterização fenotípica e molecular de bactérias Gram-negativas (BGN) isoladas de hemoculturas na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) contribui para o aprofundamento de conhecimentos sobre os agentes bacterianos associados a infecções invasivas e os respectivos perfis de resistência aos antimicrobianos (Lipworth *et al*., 2022). O estudo fornece evidências microbiológicas complementares para a vigilância da resistência antimicrobiana na UCIP e apoiar a interpretação dos padrões locais de resistência para orientação da terapia antimicrobiana e controlo das infecções causadas por BGN (Pons *et al*., 2015; Haji *et al*., 2021).

A investigação sobre a monitorização de infecções resistentes provocadas por BGN, particularmente as sépsis, é escassa, especialmente em nações de baixo e médio rendimento, entre as quais se inclui Moçambique (Seman *et al*., 2022; Dikoumba *et al*., 2023), o que compromete a eficácia do tratamento e das medidas de controlo das infecções.

O presente estudo contribui para o fornecimento de dados sobre o perfil susceptibilidade aos antibióticos de BGN isoladas em hemocultura, actualização de algoritmos e orientação da terapia antimicrobiana na UCIP do HCM.

4. Problema

As infecções multirresistentes (MDR) no grupo etário pediátrico, especialmente devido a bactérias gram-negativas (BGN), estão a aumentar em todo o mundo com uma mortalidade elevada (Falagas *et al.*, 2014).

As infecções da corrente sanguínea (ICS) são tidas como as infecções de maior gravidade nas unidades de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) e acarretam a mortalidade mais elevada, com uma mortalidade atribuível estimada em 3% e uma mortalidade bruta de 18% (Stoll *et al.*, 2002; Gray, 2004). Na UCIP de um hospital da Índia realizou-se um estudo que mostrou elevada prevalência de resistência antimicrobiana a agentes antibacterianos de utilização corrente, como a ampicilina (94,9%-90,7%), a cefotaxima (92,4%-71,4%) e a piperacilina-tazobactam (31,2%-27,5%) e levofloxacina (42,4%-39,8%) em BGN isoladas na corrente sanguínea (Wattal & Goel, 2020).

Estudos anteriores realizados em Moçambique , mostram que a incidência das infecções invasivas em crianças com idade inferior a 15 anos foi determinada uma incidência de 425 episódios por 100.000 crianças por ano, durante o interregno de 2001 a 2006, principalmente nas zonas rurais de Moçambique. Adicionalmente, as crianças menores de um ano apresentaram maior incidência de infecções invasivas, com um valor preocupante de 1.738 por 100.000 crianças por ano (Sigaúque *et al.*, 2009).

Um estudo desenvolvido em Moçambique, mais concretamente no Hospital Central de Maputo (HCM), sobre a etiologia das infecções hospitalares na unidade dos cuidados intensivos (UCI) incluindo amostras de sangue, fezes, pús urina, ponta de catecter, expetoração e exudacto faríngeo no ano de 2017, reportou 79,3% de BGN versus 20,7% de Gram-positivos, onde a maioria dos agentes etiológicos foram isolados em amostras de sangue (49,2%) (Mahaluça *et al.*, 2018).

A utilização inadequada de antimicrobianos, incluindo a automedicação, contribui para o surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana (Garcia & Comarella, 2021; Koju *et al.*, 2022). Em Moçambique, estas práticas têm sido reportadas e associadas a conhecimentos limitados sobre o uso apropriado de antimicrobianos (GARP, 2015; Mate *et al.*, 2019).

A nível global, a resistência de estirpes bacterianas a múltiplos fármacos tem vindo a aumentar, constituindo actualmente uma séria ameaça para a saúde pública. Vários

trabalhos publicados nos últimos anos documentam a circulação de agentes patogénicos bacterianos multirresistentes (Haji *et al*., 2021; Sumbana *et al*., 2021; Santona *et al*., 2022; Sumbana *et al*., 2023). As alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas encontram-se hoje severamente condicionadas pela emergência de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases (Barbosa, 2020). Estas estirpes de BGN constituem uma causa relevante de infecções nosocomiais em todo o mundo, caracterizando-se por uma disseminação rápida e progressiva, estando associadas a elevadas taxas de mortalidade e a um leque reduzido de opções de tratamento (Barbosa, 2020). Contudo, permanece limitada a informação sobre o perfil fenotípico e molecular das BGN isoladas de hemoculturas na UCIP-HCM e a sua relação com os desfechos clínicos dos pacientes, constituindo esta uma lacuna científica que fundamenta a realização do presente estudo.

4.1. Questões de pesquisa

O presente estudo teve como base as seguintes questões:

1. Qual é o perfil de susceptibilidade de isolados de bactérias Gram-negativas obtidos de hemoculturas na unidade de cuidados intensivos pediátricos do Hospital Central de Maputo?
2. Quais são os determinantes de resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas isoladas de hemoculturas na unidade de cuidados intensivos pediátricos do Hospital Central de Maputo?
3. Quais são os principais determinantes de virulência em isolados de bactérias Gram-negativas obtidos de hemoculturas na unidade de cuidados intensivos pediátricos do Hospital Central de Maputo?
4. Qual é a relação entre a presença de isolados de BGN virulentos e resistentes aos antimicrobianos, e os desfechos clínicos dos pacientes?

5. Revisão bibliográfica

5.1. Características gerais das bactérias Gram-negativas e infecções invasivas

No método de coloração de Gram, as BGN adquirem uma tonalidade rosada, resultado da sua arquitectura celular particular. Ao contrário das Gram-positivas, que possuem uma parede espessa de peptidoglicano e retêm o corante violeta, as Gram-negativas apresentam uma camada fina deste polímero, localizada no espaço periplasmático, e uma membrana externa constituída por uma bicamada lipídica que contém lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e porinas (Tortora *et al*., 2012).

Estes microrganismos são frequentemente responsáveis por infecções adquiridas em contexto hospitalar, estando a sua propagação associada à utilização de dispositivos médicos invasivos e a procedimentos cirúrgicos (Peleg & Hooper, 2010). As manifestações clínicas mais graves provocadas por BGN ocorrem ao nível do tracto respiratório inferior e da corrente sanguínea, sendo os membros da família Enterobacteriaceae os agentes mais frequentemente identificados em diversas regiões geográficas (Peleg & Hooper, 2010).

A nível mundial, tem-se assistido a um aumento das notificações de microrganismos multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii* e Enterobacteriaceae produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) ou de carbapenemases (Haji *et al*., 2021). Este fenómeno constitui actualmente um grave problema de saúde pública à escala global (WHO, 2014; CDC, 2019). Um dos principais factores que impulsionam o agravamento da resistência em BGN é a transferência horizontal de elementos genéticos móveis que contêm genes codificadores de ESBL e de carbapenemases (Tufa *et al*., 2022). Estas enzimas têm a capacidade de hidrolisar uma vasta gama de antibióticos β-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenémicos (Bevan *et al*., 2017; Tufa *et al*., 2022).

A bacteriemia, enquanto infecção invasiva, apresenta um risco significativo de mortalidade e encontra-se frequentemente associada à presença de catéteres vasculares centrais, podendo igualmente resultar de focos primários de infecção por BGN noutros órgãos, designadamente no pulmão, no tracto geniturinário ou na cavidade abdominal (Peleg & Hooper, 2010; Tufa *et al*., 2022). Em doentes vítimas de queimaduras, a bacteriemia constitui uma das principais causas de óbito, sendo responsável por 51% das

mortes (Norbury *et al*., 2016). As espécies de BGN mais frequentemente implicadas em infecções invasivas incluem *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Haji *et al*., 2021). Estes agentes já foram previamente identificados em diversos serviços hospitalares do país, incluindo o Hospital Central de Maputo (Mahaluça *et al*., 2018; Sumbana, 2019)

5.2.1. *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é uma BGN com morfologia de bastonete, frequentemente implicada em infecções oportunistas que afectam doentes imunocomprometidos e aqueles submetidos a internamentos prolongados (Mahaluça *et al*., 2018; Massinga *et al*., 2021). Na população infantil da África Subsariana, este microrganismo é um agente comum de sépsis e de infecções do tracto urinário de origem hospitalar (Massinga *et al*., 2021).

Actualmente, as infecções provocadas por *K. pneumoniae* representam um desafio crescente para a terapêutica, em consequência da emergência de estirpes multirresistentes produtoras de β-lactamases, nomeadamente β-lactamases de espectro alargado (TEM, SHV e CTX-M) e carbapenemases (KPC). Esta situação está associada ao aumento da morbilidade e da mortalidade, sobretudo entre doentes hospitalizados (Souza, 2018; Yang *et al.*, 2021). A produção de β-lactamases constitui o principal mecanismo de resistência das BGN, incluindo *K. pneumoniae*, aos antibióticos β-lactâmicos (Souza, 2018).

Uma nova *K. pneumoniae,* denominado hipervirulento (hvKp) tem sido uma preocupação global de saúde pública devido à sua invasividade (por exemplo, causar abscesso hepático piogênico, bacteremia, pneumonia), e foi reportada em várias partes do mundo, incluindo em Manhiça à 84,2 Km da cidade de Maputo e no Hospital Central de Maputo, mostrando a necessidade de continua vigilância no país (Massinga *et al.* 2021; Sumbana *et al*., 2023).

5.2.2. *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo, pertecente a família Enterobacteriaceae. Esta bacteria foi identificada pela primeira vez no laboratório de microbiologia como um BGN fermentador de lactose que pode crescer em condições aeróbicas como anaeróbicas, preferencialmente à 37ºC, e pode ser não móvel ou móvel, é oxidase negativo, produz indol, não fermenta citrato e apresenta um teste de vermelho de metilo positivo e uma reação de Voges-Proskauer negativa (Hufnagel *et al*., 2015).

A *E. coli* é a principal BGN responsável por infecções da corrente sanguínea e por infecções extra-intestinais invasivas, como a meningite neonatal, a bacterémia, pielonefrite, cistite, prostatite e sépsis, principalmente em mulheres, recém-nascidos, idosos e indivíduos imunocomprometidos (Sumbana, 2019).

Importa salientar que nem todas as estirpes de *E. coli* são patogénicas para o ser humano, uma vez que a *E. coli* comensal é um colonizador habitual da microbiota gastrointestinal (Kobayashi *et al*., 2021).

E. coli possui vários factores de virulência, incluindo toxinas (*hylA, hylD, sat*), adesinas, sideróforos e cápsulas de polissacarídeos, que lhes permitem causar infecções intestinais e extra-intestinais em seres humanos e animais (Kobayashi *et al*., 2021).

Antigamente, as infecções por *E. coli* extraintestinal patogénica (ExPEC) eram facilmente tratáveis com alguns antibióticos de primeira linha (ampicilina e trimetoprim-sulfametoxazol) (Sumbana, 2019). Contudo, a partir da década de 1990, o tratamento destas infecções tem-se tornado progressivamente mais difícil devido à emergência de resistência às cefalosporinas, fluoroquinolonas e sulfametoxazol-trimetoprim, agentes terapêuticos utilizados tanto em contexto comunitário como hospitalar, o que tem contribuído para o aumento da morbilidade, da mortalidade e dos custos económicos associados (Gastmeier *et al*., 2012; Sumbana *et al*., 2019).

A resistência de *E. coli* a estes fármacos está associada a atrasos no início da terapêutica adequada (Tumbarello *et al*., 2007) e, em isolados de ExPEC, à produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBLs) dos tipos CTX-M, TEM e SHV, bem como a β-lactamases mais recentes, como as AmpC mediadas por plasmídeos. Estas últimas conferem resistência a uma ampla gama de β-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de 1ª a 3ª geração e inibidores clássicos de β-lactamase, como o ácido clavulânico e o tazobactam, aos quais as ESBLs são habitualmente sensíveis (Estaleva *et al*., 2021).

5.2.3. *Enterobacter* spp.

O género *Enterobacter* spp. engloba várias espécies, entre as quais *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenus*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter kobei*, e *Enterobacter nimipressuralis* (Hoffmannand & Roggenkamp, 2003). Destas, *E.*

cloacae e *E. aerogenes* são as que se destacam como agentes patogénicos de relevância em infecções nosocomiais (Malekzadegan *et al*., 2017).

A *E. cloacae*, que integra a flora comensal do tracto gastrointestinal humano e animal, pode ser responsável por bacteriémia, pneumonia, infecções do tracto urinário, infecções de feridas e infecções do sistema nervoso central, afectando sobretudo doentes internados em unidades de cuidados intensivos neonatais (Sumbana, 2019; Huang *et al*., 2021). A sua patogenicidade é suportada por um conjunto de factores de virulência, incluindo a capacidade de segregar citotoxinas, enterotoxinas, hemolisinas e de formar biofilmes (Mortazavi *et al*, 2018).

Por causa da resistência intrínseca aos β-lactâmicos conferida pelos genes cromossómicos AmpC adquiridos ESBLs e enzimas carbapenemases associadas a outros factores de resistência, o manejo clínico das infecções por *E. cloacae* pode ser difícil, pelos níveis crescentes de resistência a diferentes agentes antimicrobianos, especialmente a quinolonas, aminoglicosídeos e aos β-lactâmicos (Sumbana, 2019; Annavajhala *et al.*, 2019).

As β-lactamases predominantes em *Enterobacter* spp. são do tipo CTX-M e SHV (Cheong *et al.*, 2012), constituindo também o foco no presente estudo. Essas têm sido associados a uma disseminação intra-hospitalar de CTX-M-15, que constituem um mecanismo importante de resistência à cefalosporinas de 3ª Geração (Dimitrova *et al.*, 2015).

5.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um organismo Gram-negativo não fermentador, responsável por 11% das infecções hospitalares, com grandes taxas de morte, particularmente em indivíduos imunocomprometidos (Sumbana, 2019; Mahmood *et al.*, 2022). Ela pode colonizar o trato respiratório superior, o trato urinário e o rim, e pode causar infecções na ferida cirúrgica, pneumonia e bacteremia (Mahmood *et al.*, 2022).

Os principais factores de virulência dessa bactéria são: adesões, hemolisina, exotoxinas, proteases e sideróforos (Bălăşoiu *et al.*, 2014). Os efeitos tóxicos são em grande parte mediados por factores de virulência segregados, incluindo a piocianina, a elastase (LasB) e a protease alcalina (AprA) (Bleves *et al*., 2010; Rada & Leto, 2013) utilizando o sistema de secreção do tipo III para contornar o sistema imunitário do hospedeiro e estabelecer a infecção e quatro exotoxinas (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY), sendo a ExoU a mais virulenta

e potente fosfo-lipase, que rompe a membrana plasmática e conduz a uma morte celular rápida (Sato *et al*., 2003).

Algumas estirpes de *P. aeruginosa* podem escapar à terapia antibiótica (Rice *et al*., 2010). Os antibióticos carbapenémicos, o meropenem e o imipenem foram classificados como terapia activa contra infecções por *P. aeruginosa* na última era (Mahmood *et al.*, 2022). Contudo, nos últimos anos, tem-se observado o desenvolvimento de resistência a estes fármacos, tendo a colistina e a polimixina B emergido como opções de último recurso para o tratamento de estirpes extensivamente resistentes, embora já tenham sido descritos casos de resistência a estes agentes (Mahmood *et al*., 2022).

Os mecanismos de resistência detectados em *P. aeruginosa* são múltiplos e incluem a diminuição da expressão ou a alteração da porina OprD, que reduz a permeabilidade aos antibióticos, e o aumento da expressão da bomba de efluxo MexAB-OprM, que promove a eliminação activa dos fármacos (Hong *et al*., 2015; Mahmood *et al*., 2022). Mutações ao nível da girase e da topoisomerase determinam resistência às fluoroquinolonas, enquanto a aquisição de genes de resistência confere protecção contra aminoglicosídeos e β-lactâmicos (Hong *et al*., 2015).

Em certos isolados de *P. aeruginosa*, detectou-se a ocorrência de ESBLs características da família Enterobacteriaceae, tais como TEM, SHV (Bae *et al*., 2014; Potron *et al*., 2015) e do tipo CTX-M (Potron *et al*., 2015). Foram ainda descritos seis tipos de metalo-β-lactamases (MBLs) em *P. aeruginosa*, designadamente a imipenemase (IMP), a metalo-β-lactamase codificada pelo integrão Verona (VIM), a metalo-β-lactamase de São Paulo (SPM), a imipenemase da Alemanha (GIM), a metalo-β-lactamase de Nova Deli (NDM) e a imipenemase de Florença (FIM) (Hong *et al*., 2015). Relacionados com a resistência aos antibióticos β-lactâmicos, foram igualmente identificados dois novos genes de resistência aos aminoglicosídeos, *aacA29a* e *aacA29b*, os quais se encontram localizados em associação com a cassete do gene *VIM-2*, em integrões de classe I, provenientes de amostras clínicas de *P. aeruginosa* (Poirel *et al*., 2001).

A resistência da maioria das *P. aeruginosa* aos agentes carbapenémicos deve-se à perda da proteína da membrana externa OprD, especialmente ao imipenem, que necessita desta porina para transpor a camada exterior e à hiper-expressão de mecanismos de bombeamento activo (Sumbana, 2019).

5.2.5. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii é um agente patogénico oportunista Gram-negativo não fermentativo que causa frequentemente doenças em individuos imunocomprometidos (Shi *et al.,* 2021). *A. baumannii* é frequentemente encontrada em hospitais e causa uma variedade de infecções nosocomiais e doenças iatrogénicas, incluindo infecções da corrente sanguínea, infecções urinárias, meningite e infecções de lesões cutâneas (Shi *et al.,* 2021).

A. baumannii é um dos organismos que constituem um perigo de âmbito mundial para a saúde do ser humano e um obstáculo terapêutico, na sequência da resistência crescente (Kyriakidis *et al.,* 2021). *A. baumannii* resistente aos antibióticos carbapenémicos foi classificada em 2018 pela OMS como a prioridade número um para a investigação e o desenvolvimento de antibióticos. Os carbapenémicos foram escolhidos como marcadores, porque a resistência a esta classe está comumente associada a uma ampla co-resistência a outros antibióticos (Kyriakidis *et al.,* 2021).

Dados rede de vigilância da resistência antimicrobiana da china mostraram que, de 2005 a 2018, a resistência *de A. baumannii* ao imipenem e ao meropenem aumentou cerca de duas vezes (Hu *et al.,* 2016; Hu *et al.,* 2019). A síntese de carbapenemases representa um dos principais e mais habituais processos de resistência aos carbapenémicos em *A. baumannii*. As carbapenemases do tipo OXA, designadamente a OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51 e OXA-58, são as que se encontram com maior regularidade. Destas, a OXA-23, a OXA-24, a OXA-48 e a OXA-58 são carbapenemases de origem exógena, ao passo que a OXA-51 é inerente às estirpes de *A. baumannii* (Evans *et al*., 2014; Dahdouh *et al*., 2017). Para além do exposto, foram relatados quatro tipos de MBLs em *A. baumannii*, a saber, IMP, VIM, NDM e SIM (Kyriakidis *et al*., 2021).

Os carbapenémicos era a linha de tratamento preferido das infecções por *A. baumannii* multirresistentes (MDR), mas a sua utilização anterior levou a um aumento da incidência de resistência aos carbapenémicos nos últimos anos (Nordmann *et al.*, 2019). As polimixinas são agora amplamente utilizadas como antibióticos de escolha para infecções por *A. baumannii* MDR, embora tenham sido inicialmente evitadas devido a toxicidades sistémicas (nefrotoxicidade e neurotoxicidade) (Piperaki *et al.*, 2019; Garnacho-Montero *et al.,* 2019).

5.3. Mecanismos de resistência de bactérias Gram-negativas

As estratégias de resistência bacteriana face aos antimicrobianos são designados factores de resistência, podendo ser classificados em intrínsecos e adquiridos (Verdi *et al*., 2016). A resistência intrínseca é inerente às características fenotípicas do microrganismo, sendo determinada geneticamente e transmitida de forma estável entre gerações. Por outro lado, a resistência adquirida resulta de mutações em genes reguladores ou estruturais, ou da aquisição de genes de resistência através de elementos genéticos móveis (Moreira & Freire, 2012; Verdi *et al*., 2016).

A prática da antibioticoterapia generalizada tem promovido a disseminação destes mecanismos de resistência, tornando-os particularmente comuns em ambientes nosocomiais (Cotrim *et al*., 2012; Cunha, 2014). Os principais mecanismos incluem: (i) alteração da permeabilidade da membrana celular, que impede a entrada do antibiótico na bactéria; (ii) acção de bombas de efluxo, que bombeiam o antibiótico para o exterior da célula; (iii) mutações genéticas que modificam o alvo do antibiótico, tornando-o ineficaz; e (iv) desenvolvimento da capacidade de degradar ou inactivar o antibiótico (Cotrim *et al*., 2012; Cunha, 2014).

Nos anos oitenta do século XX, testemunhou-se o aparecimento das ESBL, uma categoria de β-lactamases com capacidade para neutralizar β-lactâmicos tais como penicilinas, cefalosporinas (à excepção das cefamicinas) e aztreonam, verificando-se distintos níveis de degradação para cada composto, consoante a variedade enzimática (Gupta *et al*., 2011). Na primeira década do século XXI, surgiram as carbapenemases, as quais, entre as β-lactamases, representam a tipologia de maior significado clínico, dado que, em regra, possuem a aptidão para degradar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenemes e ácido clavulânico, conferindo às estirpes um perfil de resistência a múltiplos fármacos (Antochevis, 2017). A carbapenemase de maior relevância nos domínios clínico e epidemiológico é a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), a qual foi identificada pela primeira vez em 2001 por uma equipa norte-americana (Carvalhaes *et al*., 2013).

5.3.1. Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)

As β-lactamases de largo espectro (ESBL) são proteínas codificadas por elementos genéticos extracromossómicos, habitualmente detectadas em Enterobacteriaceae, que degradam as cefalosporinas de terceira geração, as penicilinas e os monobactâmicos

(Seman *et al*., 2022). A primeira descrição de ESBL remonta a 1983, na Alemanha, a partir de Enterobacteriaceae, e desde então tem-se constatado que as Enterobacteriaceae produtoras de ESBL constituem um perigo real para a integridade física do ser humano (Seman *et al*., 2022). A utilidade terapêutica dos fármacos disponíveis é acentuadamente diminuída em virtude da elevada proporção de BGN produtores de ESBL (Tufa *et al*., 2022).

A categorização das ESBL pode realizar-se com base nos seus atributos moleculares ou operacionais. Ambler agrupou as β-lactamases em quatro categorias (A, B, C e D), tendo por referência a homologia proteica e a afinidade de aminoácidos, as categorias A, C e D são serino-β-lactamases, enquanto a categoria B corresponde às metalo-β-lactamases (Souza, 2018). As ESBL mais prevalentes são a cefotaximase (tipo CTX-M), a temoniera (TEM) e a sulfidrilo variável reagente (SHV) (Tufa *et al*., 2022). Estas enzimas, cuja codificação decorre de genes situados em plasmídeos, possuem acentuada aptidão para se dispersarem por outras estirpes bacterianas, podendo ser detectadas em agentes patogénicos de relevo da família Enterobacteriaceae (Cunha, 2014). O surgimento de bactérias produtoras de ESBL tem ocorrido com maior incidência em indivíduos internados, com histórico de administração de antimicrobianos e utilização de dispositivos intravenosos (Souza, 2018).

5.3.1.1. Enzima SHV (variável reagente sulfídrico)

A linhagem SHV de β-lactamases aparenta ter procedência em *Klebsiella* spp., existindo presentemente variedades tais como SHV-1, SHV-5, SHV-25 e SHV-26 (Gracia *et al*., 2006). O antepassado desta categoria, a SHV-1, é ubiquitariamente encontrado em *K. pneumoniae* (Shaikh *et al*., 2015). Em numerosas estirpes de BGN, o segmento genético responsável pela produção da SHV-1 ou da sua forma precursora, a LEN-1, encontra-se situado no cromossoma bacteriano. É admissível que o gene da SHV-1 tenha derivado como um gene cromossómico em *Klebsiella* e, ulteriormente, tenha sido integrado num plasmídeo que se dispersou por outras espécies de enterobactérias. A SHV-1 é a causa de perto de 20% da insusceptibilidade à ampicilina conferida por plasmídeos BGN (Shaikh *et al*., 2015; Marques, 2016).

5.3.1.2. Enzima TEM (Temoniera)

TEM foi relatada pela primeira vez em *E. coli*, isolado em 1965, possui perfil de substrato e inibição semelhantes aos do SHV-1. Actualmente são reconhecidas variantes de TEM:

TEM-1, TEM-2, TEM-3, TEM-11, TEM-19, TEM-20, TEM-21, TEM-22, TEM-29 e TEM-102 (Gracia *et al.*, 2006). A TEM-1 apresenta aptidão para hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, tendo a TEM-3 sido a primeira variante TEM a exibir maior actividade contra cefalosporinas de largo espectro (Shaikh *et al*., 2015).

O TEM-2, o primeiro derivado do TEM-1, tinha um único aminoácido substituição da β-lactamase original. Isso causou uma mudança no ponto isoelétrico de um de 5.4-5.6, mas não alterou o perfil do substrato (Shaikh *et al.*, 2015). O TEM-3, originalmente relatado em 1989, foi o primeiro tipo TEM de β-lactamase a exibir o fenótipo ESBL (Shaikh *et al.*,2015).

5.3.1.3. Enzima CTX (Cefotaximase)

A descoberta das primeiras proteínas pertencentes à família CTX-M ocorreu nos anos finais da década de 1980, tendo-se procedido, desde então, à sequenciamento de mais de uma centena de variantes (Shaikh *et al*., 2015; Marques, 2016). Com base na composição das suas cadeias de aminoácidos, estas enzimas podem ser organizadas em cinco agrupamentos filogenéticos, designados CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Shaikh *et al*., 2015; Marques, 2016). Os grupos 1 e 2 encontram-se relacionados com a mobilização de genes de origem cromossómica provenientes da espécie *Kluyvera ascorbata*, ao passo que os grupos 8 e 9 estão associados a genes cromossómicos de *Kluyvera georgiana* (Shaikh *et al*., 2015; Marques, 2016).

O mecanismo de emergência das enzimas CTX-M é distinto do que está na origem das ESBL dos tipos TEM e SHV (Shaikh *et al*., 2015). Com efeito, enquanto as variantes SHV-ESBL e TEM-ESBL surgiram a partir de alterações pontuais na sequência de aminoácidos das enzimas preexistentes, as CTX-M-ESBL resultaram da aquisição de material genético exógeno, mediada por transferência horizontal a partir de outras espécies bacterianas, recorrendo a plasmídeos conjugativos como veículo de disseminação (Shaikh *et al*., 2015). Um aspecto molecular de particular relevância é a presença, em todas as enzimas CTX-M, de um resíduo de serina na posição 237 da cadeia polipeptídica, o qual se revela fundamental para a actividade de largo espectro que caracteriza estas β-lactamases (Shaikh *et al*., 2015).

Importa ainda salientar que a resistência aos antibióticos β-lactâmicos não se restringe à produção de enzimas inactivadoras, podendo igualmente decorrer de outros fenómenos,

tais como a modificação estrutural do local de ligação do fármaco ao seu alvo molecular, a redução da permeabilidade da membrana citoplasmática, a presença de sistemas de bombeamento activo que promovem a extrusão do antibiótico ou, ainda, a própria destruição enzimática do composto (Moreira & Freire, 2012).

5.3.2. Carbapenemases

As carbapenemases constituem um grupo de enzimas produzidas por BGN , estando entre os principais agentes responsáveis por infecções que apresentam resistência aos antimicrobianos, a produção destas enzimas determina a ineficácia dos carbapenémicos, que são fármacos de eleição no combate a infecções provocadas por microrganismos multirresistentes (Verdi *et al*., 2016).

Tendo em conta que os genes codificadores destas enzimas se encontram frequentemente em plasmídeos, as carbapenemases possuem uma notável capacidade de propagação, uma vez que facilitam a aquisição e o acúmulo de outros determinantes genéticos de resistência, este fenómeno complica significativamente as estratégias de contenção de surtos e está associado a um agravamento das taxas de letalidade (Borba *et al*., 2012). A rápida dispersão destas enzimas é favorecida, sobretudo, por elementos genéticos transponíveis, como o Tn4401, e pela transferência horizontal de plasmídeos pertencentes a diversos grupos de incompatibilidade, os quais transportam o gene *bla*KPC (Antochevis, 2017).

Do ponto de vista da sua estrutura e mecanismo de acção, as carbapenemases agrupam-se em duas categorias principais: as serino-carbapenemases e as metalo-β-lactamases (Marques, 2016). As primeiras enquadram-se nas classes A e D da classificação de Ambler, ao passo que as segundas integram a classe B. No grupo das serino-carbapenemases, incluem-se, entre outras, as enzimas GES, SME-1, IMI, NMC-a, OXA e KPC. Por seu turno, as metalo-β-lactamases mais representativas pertencem às famílias IMP, GIM, VIM, NDM e SPM (Marques, 2016).

A literatura científica regista actualmente mais de vinte variantes da enzima KPC, que surgem em consequência de mutações pontuais ao longo da mesma cadeia polipeptídica, sendo as isoformas KPC-2 e KPC-3 as que ocorrem com maior frequência (Antochevis, 2017). A KPC é a serino-carbapenemase de classe A mais disseminada geograficamente, tendo recebido esta denominação por ter sido inicialmente identificada em elementos

genéticos de natureza plasmidial num isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (Antochevis, 2017). Esta enzima possui a capacidade de degradar não apenas os carbapenémicos, como o meropenem, o ertapenem e o imipenem, mas igualmente todo o espectro de antibióticos β-lactâmicos (Souza, 2018). O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) preconiza a investigação da presença de KPC em estirpes bacterianas que evidenciem resistência a cefalosporinas de terceira geração e que apresentem uma sensibilidade reduzida aos carbapenémicos (Verdi *et al*., 2016).

5.3.3. Modificação do alvo

Este tipo de resistência decorre de alterações na sequência de aminoácidos que compõem as proteínas de ligação à penicilina, vulgarmente designadas PBPs (*penicillin-binding proteins*), o que determina uma diminuição da capacidade destas proteínas se associarem ao fármaco antimicrobiano (Moreira & Freire, 2012).

As modificações ao nível dos aminoácidos podem ter origem em diferentes processos, designadamente: (i) a aquisição de novas proteínas PBPs, que não são reconhecidas pelo antibiótico; (ii) fenómenos de recombinação entre os genes que codificam estas proteínas e que estão relacionados com a expressão de sensibilidade; ou (iii) a sobreexpressão da proteína, que conduz a um incremento dos níveis de resistência aos antibióticos da classe dos β-lactâmicos (Moreira & Freire, 2012)

5.3.4. Alteração da permeabilidade

A reduzida permeabilidade da membrana externa que caracteriza as bactérias Gram-negativas encontra-se frequentemente na origem da resistência observada face a diversos agentes antimicrobianos (Cunha, 2014). O transporte de compostos do meio exterior para o interior da célula é condicionado por um conjunto de factores, entre os quais se incluem a carga eléctrica, a conformação estrutural e as dimensões das moléculas, para além da presença de proteínas transmembranares que funcionam como canais selectivos (Moreira & Freire, 2012).

É precisamente através destes poros proteicos que os antibióticos, nomeadamente os da classe dos β-lactâmicos, penetram na célula bacteriana ou acedem ao espaço periplasmático, onde exercem a sua acção (Cunha, 2014). Assim, qualquer compromisso funcional destas proteínas pode determinar uma redução da sensibilidade a múltiplos antibióticos, uma vez que a entrada do fármaco se encontra dificultada (Cunha, 2014).

5.3.5. Bombas de efluxo

O espectro de acção de um dado antibiótico pode ser influenciado pelo tipo de bomba de efluxo presente na bactéria (Moreira & Freire, 2012). Este processo consiste na extrusão activa de compostos antimicrobianos do compartimento intracelular para o meio externo, o que confere à bactéria a capacidade de resistir à acção de certos fármacos. A título ilustrativo, menciona-se a resistência às tetraciclinas observada em *E. coli*, a qual é determinada por genes localizados em plasmídeos e se manifesta através da acção de proteínas inseridas na membrana citoplasmática do microrganismo (Moreira & Freire, 2012).

5.4. Factores de virulência em bactérias Gram-negativas

Para além dos determinantes de resistência aos antimicrobianos, a capacidade de um microrganismo desencadear doença encontra-se intimamente ligada à sua patogenicidade, a qual é determinada pela expressão de genes que codificam factores de virulência. Estes elementos moleculares conferem ao agente patogénico a aptidão para colonizar o hospedeiro, interferir com os seus processos fisiológicos e, em última análise, provocar o aparecimento de uma infecção (Nogueira, 2022).

Os factores de virulência mais relevantes estão presentes numa ampla variedade de microrganismos e incluem adesinas, toxinas, invasinas, proteases auto-transportadoras (SPATEs), sistemas de captação de ferro, bem como mecanismos que comprometem a eficácia da resposta imunitária do hospedeiro (Nogueira, 2022).

Tabela1. Factores de virulência de bactérias Gram-negativas.

Categoria funcional	**Factores de virulência**	**Referência**
Adesinas	*fimH*	Massinga *et al*., (2021)
	mrkD	
	ycfM	
Protetinas/Invasinas	*rmpA*	
	magA	
	traT	
Toxinas	*hylA*	
	hylC	
Sideróforos	*iutA*	
	fyuA	
	entB	
SPATES	*Sat*	
	sepA	
	piC	

	Siga	
	Pet	

5.5. Opções terapêuticas para as infecções invasivas causadas por Bactérias Gram-negativas

O agravamento da crise de resistência aos antimicrobianos tem colocado a resistência aos carbapenémicos em patogénios Gram-negativos como um dos maiores desafios clínicos da actualidade (Doi, 2019). Os carbapenémicos têm sido, durante largo tempo, considerados os fármacos com maior potência e espectro de acção contra microrganismos Gram-negativos multirresistentes (Doi, 2019). Com efeito, a lista de prioridades globais de bactérias resistentes a antibióticos divulgada pela Organização Mundial da Saúde em 2017 identifica os patogénios resistentes aos carbapenémicos como sendo de prioridade crítica para a investigação e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, abrangendo Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (WHO, 2017).

A emissão de um resultado laboratorial que confirme a produção de ESBL implica a exclusão de todos os β-lactâmicos do esquema terapêutico, com a única excepção dos carbapenémicos (imipenem, meropenem e ertapenem) (Doi, 2019). Contudo, a escolha final do antibiótico a utilizar deverá ser orientada pelos resultados *in vitro* dos testes de susceptibilidade, podendo recorrer-se a outras classes de antimicrobianos (Doi, 2019; CLSI, 2023).

O desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos sofreu um abrandamento significativo durante a década de 1990, mas o crescente reconhecimento dos obstáculos clínicos impostos pelas BGN resistentes aos carbapenémicos tem renovado o interesse na concepção de novas abordagens terapêuticas (Doi, 2019). Estes esforços estão a resultar, actualmente, na introdução de novos agentes com actividade contra estirpes Gram-negativas resistentes aos carbapenémicos (Doi, 2019).

Apesar da escassez de opções, algumas BGN podem ainda manter susceptibilidade às polimixinas, que constituem actualmente a base do tratamento destas infecções, bem como aos aminoglicosídeos e à tigeciclina (Vardakas & Falagas, 2017). Os aminoglicosídeos e a tigeciclina são frequentemente utilizados em associação com as polimixinas para o tratamento de estirpes produtoras de carbapenemases (Zavascki *et al*., 2013).

Em Moçambique, o tratamento das infecções por BGN segue, de um modo geral, uma estratégia escalonada, que tem início com a administração de antibióticos de largo espectro, sendo posteriormente ajustada para agentes mais específicos com base nos resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana (CTTF, 2007). Este esquema terapêutico engloba várias classes de antimicrobianos, designadamente penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas e fluoroquinolonas (CTTF, 2007).

6. Enquadramento conceptual

Bactérias Gram-negativas: Grupo de bactérias cuja parede celular apresenta uma camada delgada de peptidoglicano e uma membrana externa adicional constituída por lipopolissacarídeos (LPS), o que determina a sua coloração rósea no método de coloração de Gram, em contraste com as bactérias Gram-positivas, que possuem uma parede mais espessa e retêm o corante violeta (Tortora *et al*., 2012).

Hemocultura: Exame laboratorial que consiste no isolamento e identificação de microrganismos patogénicos presentes no sangue de doentes com suspeita clínica de infecção (Ferraz Jr. & Bonilha, 2009).

Infecção: Entrada, desenvolvimento ou multiplicação de um agente infeccioso no organismo hospedeiro, podendo manifestar-se de forma clínica ou subclínica (Porta, 2014; WHO, 2020).

Colonização: Presença de um microrganismo no hospedeiro sem que se verifiquem manifestações clínicas de doença ou resposta imunológica no momento do seu isolamento (Barbosa, 2020).

Infecção da Corrente Sanguínea (ICS): O diagnóstico de ICS pode ser estabelecido com base num dos seguintes critérios:

1. Uma ou mais hemoculturas positivas para microrganismos que não são considerados contaminantes cutâneos, desde que o mesmo microrganismo não esteja envolvido noutro foco infeccioso (Barbosa, 2020).
2. Presença de pelo menos um dos seguintes sinais ou sintomas, na ausência de outra causa não infecciosa identificada e sem relação com infecção noutra localização (a confirmar com o médico assistente do recém-nascido): instabilidade da temperatura, bradicardia, apneia, intolerância alimentar, agravamento do

desconforto respiratório, intolerância à glucose, instabilidade hemodinâmica, hipoatividade ou letargia (Barbosa, 2020).

Adicionalmente, deve verificar-se, pelo menos, uma das seguintes condições: isolamento de microrganismos contaminantes cutâneos comuns (*Staphylococcus* coagulase negativo, *Propionibacterium* spp., *Bacillus* spp. ou *Micrococcus*) em, pelo menos, duas hemoculturas colhidas em locais distintos, com um intervalo máximo de 48 horas entre as colheitas (Barbosa, 2020).

Sépsis: Infecção suspeita ou confirmada (por cultura positiva, coloração de tecidos ou proteína C reactiva – PCR) causada por qualquer agente patogénico, ou uma síndrome clínica com elevada probabilidade de infecção (Goto *et al*., 2017).

Sépsis Grave: Sépsis que se acompanha de uma das seguintes condições: Disfunção cardiovascular; ou Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA); ou Duas ou mais disfunções orgânicas adicionais (Goto *et al*., 2017).

Choque Séptico: Sépsis que se associa a disfunção cardiovascular (Goto *et al*., 2017).

7. Metodologia

7.1.Tipo/Desenho do estudo

O presente trabalho caracterizou-se por ser um estudo de natureza descritiva, com delineamento transversal e recurso a dados de carácter retrospectivo.

7.2.Local do Estudo

O estudo decorreu no Hospital Central de Maputo (HCM), instituição localizada nas coordenadas -25.9694 de latitude e 32.58819 de longitude, na Província de Maputo, em Moçambique.

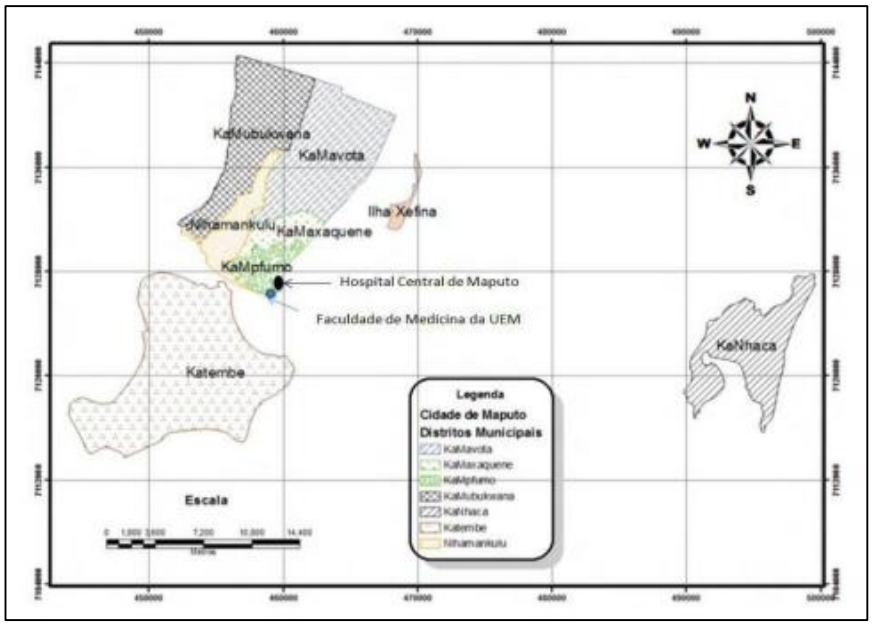


Figura 1: Mapa da cidade de Maputo, mostrando a divisão administrativa e a localização do Hospital Central de Maputo (HCM) e da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Eduardo Mondlane (UEM).

Fonte: CMCM, (2013).

O HCM é um hospital público, quaternário e de ensino, com uma capacidade aproximada de 1463 camas, dispondo de quatro Serviços de Terapia Intensiva: a UTI de Emergência, com 16 camas; a UTI de Medicina, com 6 camas; a UTI Pediátrica, com 16 camas; e a UTI Cirúrgica, com 12 camas (Mahaluça *et al*., 2018). Trata-se da maior unidade sanitária do país e constitui o principal centro de referência em Moçambique.

Foram seleccionados isolados de BGN obtidos a partir de hemoculturas colhidas na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) do HCM e conservados no Biobanco

do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina. O processamento laboratorial destes isolados, incluindo a identificação bacteriana, a determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a extracção do DNA bacteriano, foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina. A quantificação do DNA genómico foi efectuada no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (UEM). Por fim, as amostras de DNA foram enviadas à Itália, para o Laboratório *Humanizing Genomics – Macrogen Europe* especializado em análises moleculares avançadas, onde fez-se o sequenciamento do genoma completo usando a plataforma *Illumina NextSeq platform*, 30× coverage (NGX) e o *assembling* através de SPAdes 3.13.0.

7.3.Período do estudo

O estudo foi conduzido após a obtenção da aprovação ética, tendo decorrido ao longo de 12 meses, compreendidos entre Agosto de 2024 e Julho de 2025. Os isolados bacterianos foram provenientes de hemoculturas processadas no intervalo de Janeiro a Dezembro de 2023.

7.4. População do estudo

A população em estudo foi constituída por 16 isolados de BGN, recuperados de hemoculturas de doentes internados na UCIP do HCM, os quais se encontravam armazenados no Biobanco do Laboratório de Microbiologia da FAMED da UEM, relativamente ao período compreendido entre Janeiro e Dezembro de 2023.

7.5.Critérios de inclusão e de exclusão

Foram integrados no estudo todos isolados de BGN de amostras de hemoculturas provenientes da UCIP do HCM, armazenados no Biobanco do Laboratório de Microbiologia da FAMED da UEM, no período de Janeiro a Dezembro de 2023. E foram excluídos do estudo todos os isolados cuja sua subcultura apresentou uma contaminação bacteriana.

7.6. Modo de selecção das amostras, amostragem e tamanho da amostra

Foram recuperados todos isolados de BGN de amostras de hemoculturas provenientes da UCIP do HCM, armazenados no Biobanco do Laboratório de Microbiologia da FAMED da UEM e a amostragem foi não probabilística por conveniência. Não foi efectuado qualquer cálculo para determinação do tamanho da amostra, uma vez que foram incluídas

a totalidade das amostras colhidas durante o período definido para o estudo (von Elm *et al*., 2007).

7.7.Procedimentos, técnicas e instrumentos de recolha de dados

7.7.1. Colheita da amostra, dados demográficos e clínicos

No âmbito das actividades de Vigilância Laboratorial de Resistência aos Antibióticos no HCM (*Laboratory-based Surveillance of antibiotic resistance in "Hospital Central de Maputo*), foram obtidos isolados de bacilos Gram-negativos (BGN), provenientes de amostras de hemoculturas de doentes internados na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) do Hospital Central de Maputo (HCM). Os isolados foram recuperados do Biobanco do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane (FAMED-UEM) com base nas informações registadas no livro de registo do laboratório. Esses isolados estavam conservados em meio de cultura líquido *Skim Milk,* armazenados a -80 °C. Posteriormente, foram submetidos a subcultivo em ágar MacConkey, com o objectivo de realizar caracterizações fenotípicas e moleculares subsequentes.

A identificação preliminar das espécies bacterianas foi realizada previamente no âmbito do estudo de Vigilância Laboratorial de Resistência aos Antibióticos no HCM conduzido pelo laboratório de Microbiologia da FAMED, estando os dados devidamente registados no respectivo livro de registo. A partir desse livro de registo, foram colhidos os dados demográficos e clínicos dos pacientes, os quais foram posteriormente organizados numa base de dados construída no *software Microsoft Excel*. Ressalta-se que não houve qualquer contacto com os pacientes, sendo que todos os isolados estavam devidamente codificados, assegurando o anonimato e a confidencialidade das informações.

7.7.2. Procedimentos laboratoriais

7.7.2.1. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de espécies de bactérias Gram-negativas

Para a avaliação da susceptibilidade das BGN isoladas aos diferentes agentes antimicrobianos, recorreu-se ao método de difusão em disco, conforme prática adoptada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina, com base nos procedimentos estabelecidos pelo CLSI, (2017). Trata-se de uma técnica amplamente utilizada também em laboratórios clínicos e de saúde pública no país (CLSI, 2017). O painel de antibióticos

testados abrangeu diversas classes terapêuticas, designadamente β-lactâmicos(penicilinas, cefalosporinas e carbapenémicos), quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclinas e nitrofuranos (Tabela 1).

A preparação do inóculo bacteriano obedeceu aos seguintes passos: a partir de uma placa de Ágar MacConkey com crescimento puro, seleccionaram-se três a cinco colónias bem isoladas das bactérias Gram-negativas em estudo. Com o auxílio de uma ansa bacteriológica, tocou-se suavemente a superfície de cada colónia e transferiu-se o material para um tubo de ensaio estéril contendo 5 mL de soro fisiológico, ajustando-se a turvação à escala 0.5 de MacFarland (EUA Grant Instruments Lda.). Procedeu-se, em seguida, a uma agitação breve em vortex, obtendo-se uma suspensão com uma concentração aproximada de 1 a 2 × 10^8 UFC/mL.

De imediato, as suspensões bacterianas foram inoculadas em placas contendo meio de cultura Ágar Mueller-Hinton, que corresponde ao meio de eleição utilizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina para este fim. As placas e os discos de antibióticos, previamente conservados a baixa temperatura, foram retirados do frigorífico com uma antecedência de 20 a 30 minutos, de modo a atingirem a temperatura ambiente antes da execução do ensaio. Com um *swab* estéril, mergulhou-se na suspensão bacteriana contida no tubo, tendo o cuidado de remover o excesso de líquido, comprimindo a haste contra a parede do tubo. De seguida, procedeu-se à semeadura da suspensão sobre a superfície do Ágar Mueller-Hinton, efectuando movimentos em três direcções diferentes, de forma a obter-se um crescimento bacteriano confluente. Com o auxílio de uma pinça previamente flambada, colocaram-se os discos de antibióticos sobre a superfície do ágar, assegurando uma distância mínima de 2 cm entre cada disco e a borda da placa e de, pelo menos, 3 cm entre discos adjacentes. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C durante um período de 18 a 24 horas.

Interpretação do antibiograma (TSA)

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se à leitura e interpretação dos halos de inibição, utilizando uma craveira para medição dos diâmetros. Os resultados foram classificados como sensível, intermédio ou resistente, de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI, (2023), adoptados como referência internacional (Tabela 2).

Adicionalmente, os isolados bacterianos foram categorizados quanto ao seu perfil de resistência antimicrobiana. Considerou-se como multirresistente (MDR) todo o isolado que apresentasse ausência de susceptibilidade a, pelo menos, um agente antimicrobiano em três ou mais classes terapêuticas distintas, de acordo com a definição padronizada proposta por Magiorakos *et al*., (2012), amplamente utilizada em estudos de vigilância da resistência antimicrobiana.

Tabela 2. Tamanho e concentrações dos halos dos antibióticos que foram testados, segundo CLSI, 2023.

Grupo de antibióticos	**Agentes Antimicrobianos**	**Concentração**	**Zona do diâmetro**		
			S	I	R
Penicilinas	Ampicilina	10 µg	≥ 17	14-16	≤ 13
	Amoxicilina-ácido clavulánico	20/10 µg	≥ 18	14-17	≤ 13
Cefalosporinas	Cefoxitina II	30 µg	≥ 18	15-17	≤ 14
	Ceftriaxona III	30 µg	≥ 23	20-22	≤ 19
	Ceftazidima III	30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17
Carbapenémicos	Ertapenem	10 µg	≥22	19-21	≤ 18
	Imipenem	10 µg	≥23	20-22	≤ 19
	Meropenem	10 µg	≥23	20-22	≤ 19
Quinolonas	Ácido nalidíxico	30 µg	≥19	14-18	≤ 13
	Ciprofloxacina	5 µg	≥26	22-25	≤ 21
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10 µg	≥18	15-17	≤ 14
	Tobramicina	10 µg	≥17	13-16	≤ 12
Sulfonamidas	Trimetoprima-sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤ 10
Tetraciclinas	Tetraciclina	30 µg	≥15	12-14	≤ 11
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	300 µg	≥17	15-16	≤ 14

Fonte: CLSI, (2023).

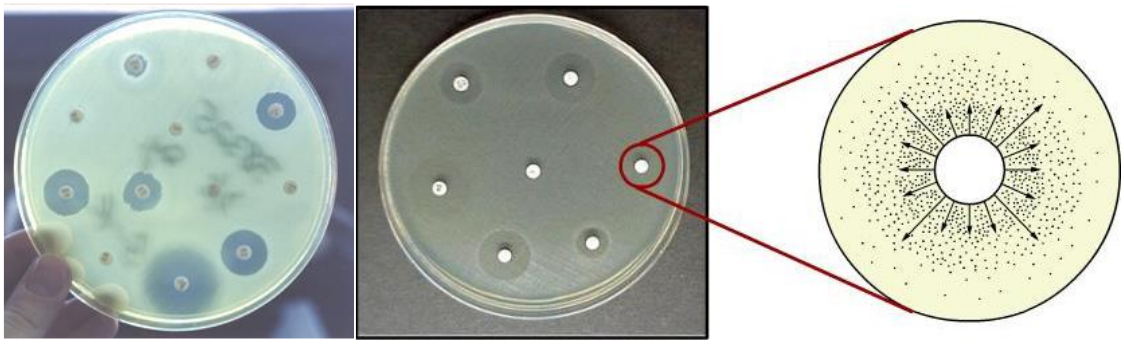


Figura 2. Determinação do perfil de susceptibilidade a antibióticos através do método de disco-difusão.

Fonte: Carmona, (2017).

7.7.2.2. Extracção do DNA das bactérias Gram-negativas

O DNA foi extraído usando o Kit QIAGEN e o respectivo protocolo. Foram transferidos 1000 µl da subcultura da suspensão bacteriana em LB Broth e posteriormente centrifugou-se. O *pellet* obtido foi ressuspenso em 180 µL do tampão ATL, ao qual se adicionaram 20 µL de proteinase K. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 56°C durante 60 minutos. Após este período, adicionaram-se 200 µL do tampão AL e 200 µL de etanol (96-100%), procedendo-se a uma nova centrifugação. Transferiu-se toda solução da amostra para a coluna de QIAGEN e centrifugou-se. A coluna foi então removida e colocada num novo tubo colector, tendo-se adicionado 500 µL do tampão AW1, seguido de uma centrifugação. Descartou-se o tubo colector e a coluna foi transferida para outro tubo colector, onde se adicionaram 500 µL do tampão AW2, seguindo-se nova centrifugação. O tubo colector foi descartado novamente e colocado num tubo de Eppendorf. Pipetou-se 200 µl do tampão eluidor (Baffer AE), incubou-se a temperatura ambiente durante 1min, posteriormente centrifugou-se. E por fim descartou-se a coluna, quantificou-se o DNA e armazenou-se à -20 ^{o}C (Massinga *et al.*, 2021).

7.7.2.3.Quantificação do DNA genómico das bactérias Gram-negativas

O DNA extraído no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia da FAMED foi transportado, acondicionado em gelo seco, para o Laboratório do Centro de Biotecnologia. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop, de acordo com o protocolo descrito por Desjardins e Conklin (2010).

O NanoDrop é uma técnica espectrofotométrica prática, rápida, e comum em laboratórios de biologia molecular. O equipamento mede a absorbância de luz UV pelo DNA a 260 nm (A260), o que permite estimar a concentração do ácido nucleico. Para a quantificação, foi utilizado o modo de medição para DNA, após a calibração do equipamento com o tampão utilizado como "*Blank*". A concentração do DNA foi expressa em ng/µL e a sua pureza foi avaliada pelas razões A260/A280 e A260/A230, utilizadas como indicadores de contaminação por proteínas e por compostos orgânicos, respectivamente.

7.7.2.4.Sequenciamento do genoma completo e análise

As amostras de DNA genómico foram enviadas para o laboratório do *Humanizing Genomics-Macrogen Europe* na Itália para o sequenciamento do genoma completo de 11

isolados de BGN. Foi feito o sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando a plataforma *Illumina NextSeq*, com uma cobertura de 30x. A montagem dos genomas foi feita utilizando montagem *de novo* com a feramenta web SPAdes 3.13.0. (Sumbana, 2019). As análises das sequências genómicas foram feitas por meio de ferramentas bioinformáticas disponíveis *online* e em plataformas especializadas (Sumbana, 2019).

As espécies bacterianas foram confirmadas com recurso às ferramentas do Centro de Epidemiologia Genómica (CGE), disponíveis em http://www.genomicepidemiology.org, usando o *PathogenFinder* (https://genepi.dk/pathogenfinder) e *KmerFinder* (https://genepi.dk/speciesfinder/), acessadas em Março de 2026 (Sumbana, 2019).

Os tipos capsulares (K) e serótipos de lipopolissacarídeo (O) foram determinados usando a plataforma *Kaptive Web* (https://kaptive-web.erc.monash.edu/), aplicada para isolados de *Klebsiella* spp. e *Acinetobacter* spp., acessada em 16 de Março de 2026 (Wick *et al.*, 2018).

A tipagem molecular foi feita usando a ferramenta *MLST 2.0*, disponível no CGE (http://www.genomicepidemiology.org), permitindo a determinação dos *sequence types* (ST) com base no esquema *multilocus*. A análise foi realizada em 10 de Março de 2026 (Sumbana, 2019).

Os genes de resistência aos antimicrobianos foram identificados usando o *ResFinder 4.1* (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/), acessado em 09 de Março de 2026, considerando os parâmetros padrão da ferramenta (Sumbana, 2019).

Os factores de virulência em isolados de *E. coli* foram identificados através da ferramenta *VirulenceFinder* (https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/), acessado em 11 de Março de 2026 (Sumbana, 2019), e para isolados de *Klebsiella* spp. Os factores de virulência foram identificados usando o *software ABRicate*, com a base de dados *VFDB* (*Virulence Factors Database*), através da plataforma *Galaxy* (https://usegalaxy.eu/), acessada em 16 de Março de 2026 (Seemann, 2016).

Os replicões plasmidiais foram identificados usando o *PlasmidFinder 2.1*, disponível no CGE (https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/), aplicado às Enterobacteriaceae, acessado em 17 de Março de 2026 (Sumbana, 2019).

7.7.3. Relação genótipo-fenótipo com os desfechos clínicos

Os determinantes de resistência e de virulência identificados nos isolados bacterianos foram integrados com informações fenotípicas e clínicas, para estabelecer possíveis relações entre os perfis genéticos das bactérias e os desfechos clínicos dos pacientes com sépsis.

8. Variáveis do estudo

Objectivos específicos	**Variáveis**	**Fonte de informação**	**Tipo de teste**
Descrever as características sociodemográficas dos pacientes com sépsis.	Variável qualitativa nominal: idade, sexo, proveniência	Livro de registo	Análise estatística descritiva que consistiu em cálculos de frequências, médias e desvio padrão
Comparar o resultado da identificação das espécies de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de hemoculturas obtido por métodos fenotípicos (meios seletivos/diferenciais e API 20E) com a análise genómica *in silico*.	Variável qualitativa nominal: nome das espécies encontradas em hemoculturas .	Livro de registo, e identificaçao molecular das espécies	Análise estatística descritiva que consistiu em cálculos de frequências absolutas e relativas e avaliação da concordância entre os métodos de identificação fenotípica e *in silico*.
Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados aos antibióticos de bactérias Gram-negativas.	Variável qualitativa ordinal: Sensível, Intermediário e Resistente.Variável qualitativa nominal: antibióticos testados	O TSA será feito usando disco-difusão Kirby Bauer e antibióticos das classes: Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, Quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclina	Análise estatística descritiva que consistiu em cálculos de frequências absolutas e relativas

Identificar os genes de resistência de espécies de bactérias Gram-negativas.	Variável qualitativa nominal: genes de resistência (ex: *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{NDM)}$	Sequenciamento do genoma completo dos isolados de BGN	Análise estatística descritiva que consistiu em cálculos de frequências absolutas e relativas
Identificar os genes de virulência de espécies de bactérias Gram-negativas.	Variável qualitativa nominal: genes de virulência	Sequenciamento do genoma completo dos isolados de BGN	Análise estatística descritiva que consistiu em cálculos de frequências absolutas e relativas
Relacionar os desfechos clínicos dos pacientes ao perfil de virulência e resistência dos isolados de bactérias Gram-negativas.	Variável qualitativa nominal: desfecho clínico (óbito ou alta) e genes de resistência.	Livro de registo e resultado do TSA e detecção dos genótipos através do sequenciamento do genoma completo de BGN	Comparações descritivas entre grupos

9. Plano de gestão e análise de dados

Para o processamento e análise dos dados, recorreu-se ao *software Microsoft Excel* 2016. Com o auxílio desta ferramenta, procedeu-se ao cálculo das frequências absolutas (n) e relativas (%) para a distribuição dos isolados de BGN, bem como para a determinação das proporções de susceptibilidade antimicrobiana, dos determinantes genéticos de resistência e dos factores de virulência identificados. A relação entre os desfechos clínicos dos pacientes e os perfis de virulência e resistência dos isolados de BGN foi avaliada de forma descritiva, por meio da comparação das distribuições e frequências observadas. Os resultados obtidos foram compilados e apresentados sob a forma de tabelas e gráficos, igualmente concebidos no programa *Microsoft Excel.*

10. Considerações éticas

O presente trabalho obteve aprovação por parte do Comité Institucional de Bioética para a Saúde da Faculdade de Medicina (CIBS-FAMED), tendo-lhe sido atribuído o número de referência CIBS FM&HCM/37/2024 (Anexo 2). O estudo incorporou isolados de

BGN provenientes de hemoculturas, os quais foram recolhidos no âmbito de uma investigação primária de vigilância laboratorial da resistência aos antibióticos no Hospital Central de Maputo (*Laboratory-based Surveillance of antibiotic resistance in "Hospital Central de Maputo"*). Os dados foram registados de modo anónimo e codificado, garantindo a protecção da identidade dos participantes. O acesso à informação recolhida foi restrito exclusivamente à equipa de investigação, tendo os dados sido utilizados unicamente para os fins do presente estudo, não sendo permitida a sua utilização para outras finalidades.

10.1. Potenciais riscos e como foram minimizados, benefícios e confidencialidade

Os principais riscos do estudo incluíram a possibilidade de reidentificação dos participantes, e a exposição dos investigadores durante a manipulação dos isolados bacterianos. Para minimizar estes riscos, foram removidos todos os identificadores pessoais dos participantes, o manuseamento da informação esteve limitado unicamente aos membros da equipa de investigação autorizada e foram adotadas medidas de biossegurança de nível 2 durante os procedimentos laboratoriais.

Apesar de os participantes não terem obtido qualquer benefício directo, o trabalho realizado permitiu reunir dados relevantes acerca dos padrões de resistência antimicrobiana e dos factores de virulência de bactérias Gram-negativas invasivas isoladas na UCIP do HCM, constituindo, assim, uma fonte de informação útil para a vigilância epidemiológica e para o controlo destas infecções.

A confidencialidade dos dados foi assegurada através da codificação das informações dos participantes, do armazenamento seguro dos dados em sistemas protegidos por palavra-passe e da restrição do acesso apenas aos investigadores autorizados. Os resultados foram divulgados de forma agregada, sem identificação individual dos participantes, garantindo a proteção e confidencialidade das informações durante e após a conclusão do estudo.

11. Resultados

11.1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com sépsis provenientes da UCIP-HCM entre Janeiro e Dezembro de 2023

No presente estudo foram incluídos 16 isolados de bactérias Gram-negativas (BGN) obtidos de hemoculturas provenientes de doentes internados na UCIP-HCM, entre Janeiro e Dezembro de 2023, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina. Estes isolados estavam armazenados no Biobanco do Laboratório de Microbiologia da FAMED.

Os pacientes associados aos isolados incluídos (16 isolados) foram na sua maioria do sexo masculino 56% (9/16) comparativamente a 44% (7/16) do sexo feminino. Todos os pacientes tinham idade <5 anos, onde na sua maioria eram crianças com idade entre 13 aos 60 meses 50% (8/16), seguida da faixa dos 2 aos 12 meses, com 44% (7/16). Apenas 6% (1/16) dos pacientes tinham idade entre 0 e 1 mês. Todos os pacientes dos quais provinham os isolados incluídos no estudo apresentavam diagnóstico clínico de sépsis à admissão na UCIP-HCM.

As informações demográficas e clínicas apresentadas foram obtidas do livro de registo da Faculdade de Medicina, associados ao processamento laboratorial das hemoculturas. Os resultados apresentados basearam-se exclusivamente na análise dos isolados bacterianos e nos dados clínicos secundários disponíveis (Tabela 3).

Tabela 3. Características demográficas e clínicas dos pacientes com sépsis dos quais foram obtidos os isolados de bactérias Gram-negativas incluídos no presente estudo.

Variáveis	Pacientes com sépsis (*n*=16)	Percentagem (%)
Sexo		
Masculino	9	56
Feminino	7	44
Faixas etária		
0–1 Mês	1	6
2–12 Meses	7	44
13–60 Meses	8	50
Diagnóstico clínico		
Sépsis	16	100

11.2. Frequência de espécies de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de hemocultura provenientes da UCIP-HCM entre Janeiro e Dezembro de 2023

Dos 16 isolados de BGN incluídos no estudo, observou-se maior frequência de *Klebsiella* spp. com 5 (31,3%) e menor frequência de *Escherichia coli* 1 (6,3%), *P. aeruginosa* 1 (6,25%) e *Cronobacter spp.* 1 (6,3%). Adicionalmente, registou-se 2 isolados de BGN com identificação da espécie inconclusiva 2 (12,5%) (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de espécies de bactérias Gram-negativas identificadas de hemoculturas na UCIP-HCM, Janeiro e Dezembro de 2023.

Espécie bacteriana	Número de isolados (*n*=16)	Frequência (%)
Klebsiella spp.	5	31,3
Enterobacter spp.	4	25
A. baumannii	2	12,5
E. coli	1	6,3
P. aeruginosa	1	6,3
Cronobacter spp.	1	6,3
Identificação inconclusiva	2	12,5

11.3. Comparação do resultado da identificação da espécie de bactérias Gram-negativas de isolados de amostras de hemocultura obtido por métodos bioquímicos com a análise genómica *in silico*

Dos 16 isolados de BGN previamente identificados por métodos bioquímicos, foi possível sequenciar 11 isolados (68,8%). O sequenciamento do genoma completo não foi feito para os restantes cinco isolados (31,3%).

Do total de 11 isolados sequenciados, a análise genómica *in silico* permitiu a identificação ao nível da espécie em 10 (90,9%) isolados. Destes, observou-se concordância ao nível da espécie entre os resultados da identificação bioquímica em seis isolados 6 (54,5%).

Dois isolados 2 (18,2%), previamente identificados como *E. cloacae* através dos métodos bioquímicos, a análise genómica confirmou o género *Enterobacter* spp., porém identificou as espécies *E. hormaechei* e *E. kobei*, evidenciando concordância apenas ao nível do género. Na análise bioquímica, 3/11 (27,3%) isolados (8922 CT, 8769 EK e 7548 JME) apresentaram resultados com baixa discriminação no API 20E, caracterizados pela

atribuição de mais de uma espécie com percentagem de identificação (%ID) inferior a 80%. Adicionalmente, 1/5 (20%) isolado não sequenciado (8925 AC) apresentou igualmente perfil de baixa discriminação (Anexo 3).

Dois 2/11 (18,2%) isolados (8922 CT e 7548 JME), que haviam sido identificados com baixa discriminação através da análise bioquímica, foram identificados pela análise genómica *in silico* como *A. baumannii* e *E. hormaechei*, respectivamente. Por outro lado, um 1/11 (9,1%) isolado codificado como 8769 EK que também apresentou baixa discriminação através da análise bioquímica, apresentou um perfil genómico atípico e polimicrobiano na análise *in silico*, revelando a presença simultânea de material genético de *Staphylococcus saprophyticus* (Gram-positivo), *E. coli* e *K. pneumoniae* (Anexo 4). Contudo, o isolado original demonstrou crescimento exclusivo e característico em ágar MacConkey, com morfologia microscópica pura de bacilo Gram-negativo. Os resultados comparativos entre os métodos de identificação encontram-se ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação do resultado da identificação bioquímica dos isolados BGN e *in silico*

Código dos isolados bacterianos	**Resultado da identificação Bioquímica**	**Teste complementar**	**Resultado *in silico***
2835 IJ	*K. pneumoniae*	NA	*K. pneumoniae*
0554 AC	*K. pneumoniae*	NA	*K. pneumoniae*
8839 NC	*K. pneumoniae*	NA	*K. pneumoniae*
8923 EM	*E. cloacae*	NA	*E. hormaechei*
8724 EC	*E. cloacae*	NA	*E. kobei*
8922 CT	Baixa discriminação (*Pseudomonas oryzihabitans, Ochrobactrum anthropi, Bordetella/ Alcaligenes/Moraxella spp, Non-fermenter* spp.)	Possibilidade de *A. baumanii/calcoaceticus*	*A. baumanii*
8769 EK	Baixa discriminação (*Pseudomonas oryzihabitans, Ochrobactrum anthropi, Bordetella/ Alcaligenes/Moraxella spp, Non-fermenter* spp.)	Possibilidade de *A. baumanii/calcoaceticus*	*Staphylococcus saprophyticus, E. coli e K. pneumoniae*
7548 JME	Baixa discriminação (*Pseudomonas oryzihabitans, Ochrobactrum anthropi, Bordetella/ Alcaligenes/Moraxella spp, Non-fermenter* spp.)	Possibilidade de *A. baumanii/calcoaceticus*	*E. hormaechei*
8814 LS	*A. baumanii*	NA	*A. baumanii*
0561FN	*E. coli*	NA	*E. coli*
0633 LD	*P. aeruginosa*	NA	*P. aeruginosa*
0574MJM	*E. cloacae*	NA	NS

0628OF	*K. pneumoniae ssp ozaenae*	NA	NS
0556UM	*K. pneumoniae*	NA	NS
7697NC	*Cronobacter* spp.	NA	NS
8925AC	Baixa discriminação (*Pseudomonas oryzihabitans, Ochrobactrum anthropi, Bordetella/ Alcaligenes/Moraxella spp, Non-fermenter* spp.)	Possibilidade de *A. baumanii/calcoaceticus*	NS

Legenda: NA = Não aplicável; NS = Não sequenciado.

11.4. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de espécies de bactérias Gram-negativas

Para a caracterização fenotípica das estirpes, foram testados até 15 antibióticos distribuídos em 6 classes terapêuticos principais (β-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, sulfonamidas e nitrofuranos) pelo método de disco difusão. No total dos 16 isolados analisados, 100% foram categorizados por multireristentes (MDR) segundo os critérios internacionais. Adicionalmente as estirpes de *E. coli* e *P. aeruginosa* mostraram uma taxa de resistência de 100% a todos os antibióticos testados.

11.4.1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli*

O isolado de *E. coli* (*n* = 1) apresentou resistência absoluta (100%) aos antimicrobianos testados incluindo beta-lactâmicos, carbapenémicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e outros agentes antimicrobianos.

11.4.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella* spp.

Foram identificados 5 (31,3%) isolados de *Klebsiella* spp. em pacientes com sépsis internados na UCIP-HCM. Notavelmente, 100% destes isolados demonstraram resistência aos beta-lactâmicos testados (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ceftriaxona, cefoxitina, ceftazidima, ertapenem e meropenem) estendendo-se igualmente à associação ao sulfametoxazol-trimetoprim.

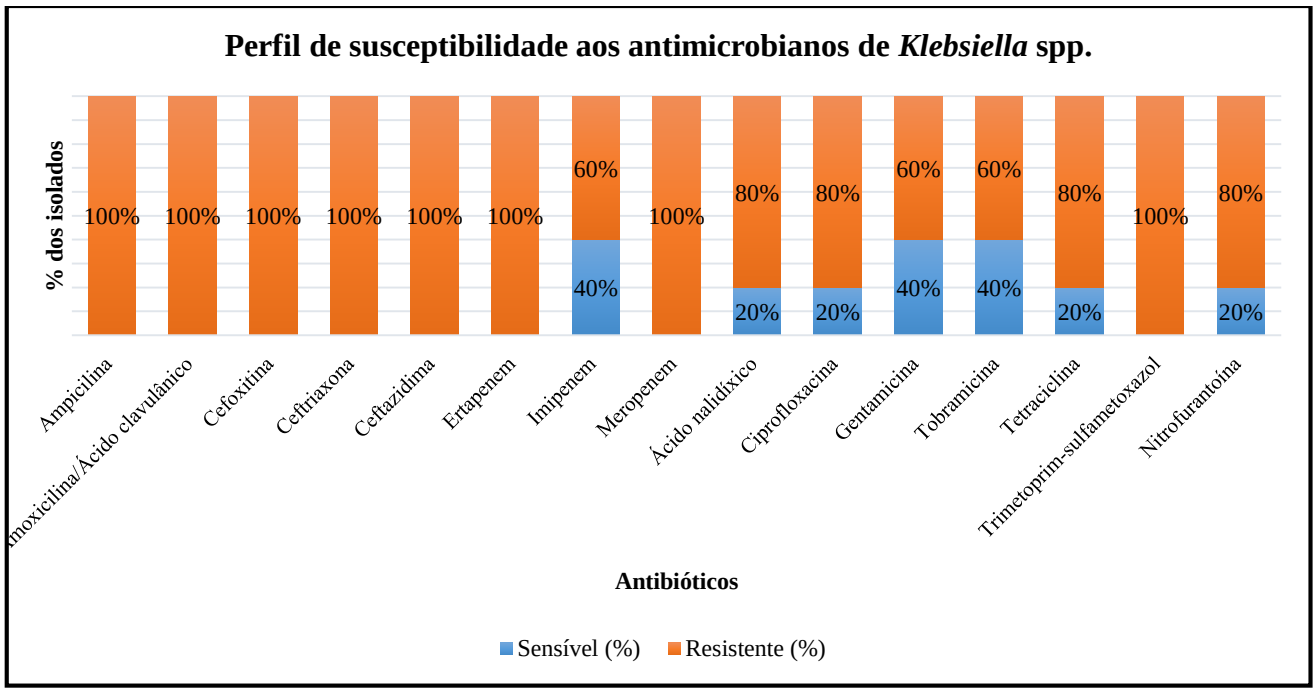


Figura 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella* spp. provenientes de pacientes com sépsis internados na UCIP-HCM.

11.4.3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Enterobacter* spp.

Os 4 (25%) isolados de *Enterobacter* spp. apresentaram resistência variando entre 25% e 100%. Observou-se resistência de 100% à ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima, ertapenem, meropenem, ácido nalidíxico e sulfametoxazol-trimetoprim (Figura 5).

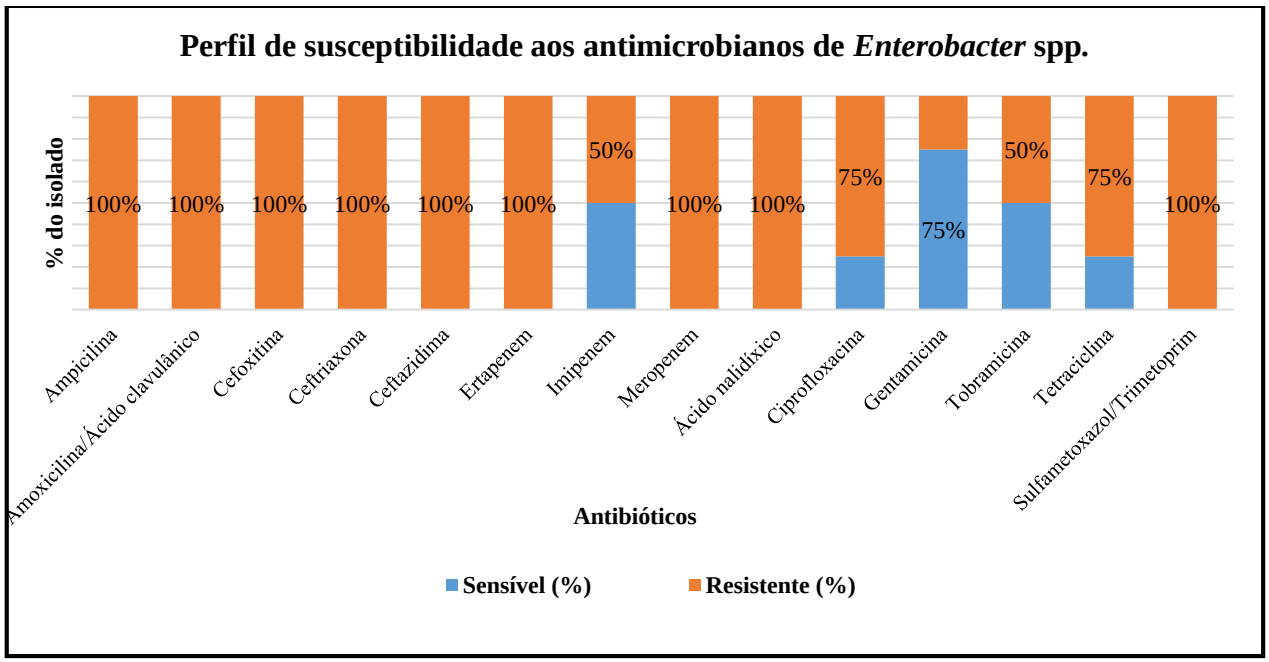


Figura 4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Enterobacter* spp. provenientes de pacientes com sépsis internados na UCIP-HCM.

11.4.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii*

Os dois isolados de *A. baumannii* apresentaram frequências de resistência variando entre 50% e 100%. Ademais, estes isolados foram 100% resistentes aos β-lactâmicos avaliados (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ceftriaxona, ceftazidima, ertapenem e meropenem), bem como resistência à cefoxitina, imipenem, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim e nitrofurantoína (50%) (Figura 5).

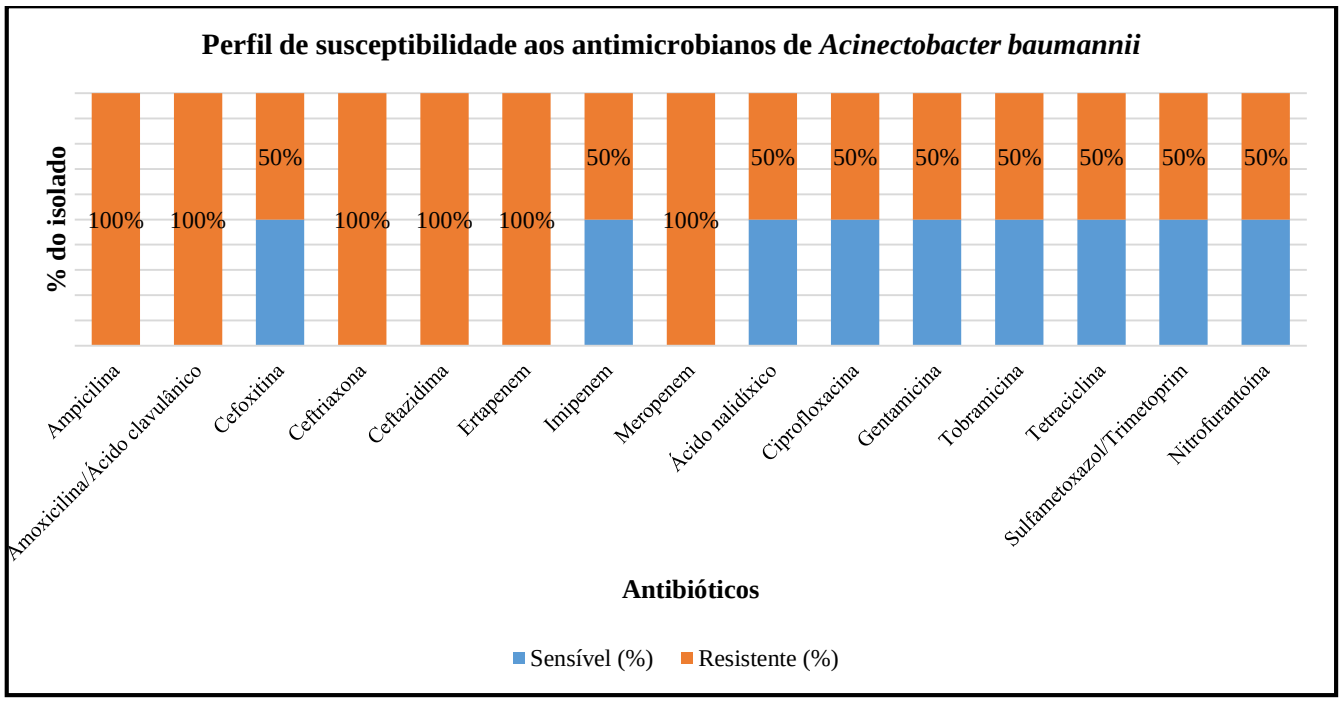


Figura 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *A. baumannii* provenientes de pacientes com sépsis internados na UCIP-HCM.

11.4.5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa*

O isolado de *P. aeruginosa* apresentou 100% de resistência aos antimicrobianos testados e MDR.

11.4.6. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Cronobacter* spp.

O isolado de *Cronobacter* spp. apresentou resistentência a todos os antibióticos testados, com excepção da ciprofloxacina, para a qual demonstrou um perfil de susceptibilidade intermediária.

11.5. Concordância entre o perfil de resistência antimicrobiana e molecular dos isolados de bactérias Gram-negativas

A análise baseada em mapas de calor (*heatmap*) revelou a presença de múltiplos determinantes genéticos de resistência antimicrobiana (resistoma) amplamente distribuídos entre os isolados bacterianos Gram-negativos, permitindo paralelamente a caracterização dos seus respetivos perfis clonais (*Sequence Types* - STs). Do total de 11 genomas completos obtidos, foram integradas no mapa de calor 10 sequências viáveis (excluindo-se o isolado polimicrobiano 8769 EK), assim distribuidos: *K. pneumoniae* 3 (30%), *Enterobacter* spp. 3 (30%), *A. baumannii* 2 (20%), *E. coli* 1 (10%) e *P. aeruginosa* 1 (10%).

O isolado de *E. coli* clonalmente identificado como ST167 albergava os genes *bla*CTX-M-15 (ESBL) e *bla*NDM-5 (carbapenemase), associados à resistência de amplo espectro aos β-lactâmicos e carbapenêmicos. Adicionalmente, este resistoma continha genes de resistência aos aminoglicosídeos, nomeadamente o *aac(6')-Ib-cr* e a metilase de ARN ribossómico *rmtB* (que confere resistência de alto nível a todos os aminoglicosídeos clínicos), além dos determinantes *sul1* e *tet(A)*, responsáveis pela resistência às sulfonamidas e tetraciclinas, respetivamente (Figura 6).

No grupo dos isolados de *K. pneumoniae* (pertencentes às linhagens ST231 e ST37) observou-se a presença de genes associados aos β-lactâmicos e carbapenémicos pertencentes às famílias *bla*TEM-1B, *bla*CTX-M-15 e *bla*SHV e *bla*NDM-5. Adicionalmente, foram identificados genes marcadores de resistência aos aminoglicosídeos, como *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*. Os determinantes de suscetibilidade reduzida às quinolonas do tipo *qnr* (*qnrB1* e *qnrS1*), bem como os genes *sul1* e *sul2* e dos determinantes de resistência às tetraciclinas (*tet(A) e tet(D)*) (Figura 6).

Os isolados de *A. baumannii* apresentaram como possíveis tipos de linhagens (STs) os ST1961 ou ST944, de acordo com a análise por MLST *in silico*, não tendo sido possível atribuir um único ST. Esses apresentaram genes associados a β-lactâmicos e

carbapenémicos *bla*OXA-90 e *bla*NDM-1. Adicionalmente, foram identificados genes de resistência aos aminoglicosídeos, incluindo *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*, bem como os genes *sul1* e *sul2* (Figura 6).

Nos isolados de *P. aeruginosa* ST357 identificaram-se os genes *bla*OXA-50 e *bla*NDM associados à resistência a β-lactâmicos e carbapenémicos *bla*OXA-50 e *bla*NDM. Adicionalmente, os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram genes associados às tetraciclinas (*tet(A) e tet(G)*) e aos aminoglicosídeos, incluindo *aph(3')-IIb*. Entre os determinantes de resistência às quinolonas, foi identificado o gene *qnrVC1*. O gene *sul1*, que confere resistência às sulfonamidas, também foi detectado neste isolado (Figura 6).

Os isolados de *Enterobacter* spp. (*E. hormaechei* ST2692 e ST270, *E. kobei* para o qual a análise por MLST *in silico* identificou como possíveis os ST125, ST1990 ou ST2543, não sendo possível atribuir um único ST.), apresentaram genes associados à resistência aos β-lactâmicos e carbapenémicos, incluindo *bla*TEM-1B, *bla*TEM-181, *bla*CTX-M-15, *bla*OXA-1 e *bla*NDM-1. Adicionalmente, foram identificados genes de resistência aos aminoglicosídeos, incluindo *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* e *aac(6')-Ib-cr*. Quanto à resistência às quinolonas foram identificados os genes *qnrB1*, *qnrS1*, *oqxA* e *oqxB*. Os genes *sul2* e *tet(A)*, que conferem resistência às sulfonamidas e tetraciclinas, respectivamente, também foram detectados nestes isolados. A distribuição dos genes de resistência entre os diferentes *sequence types* encontra-se apresentada na (Figura 6).

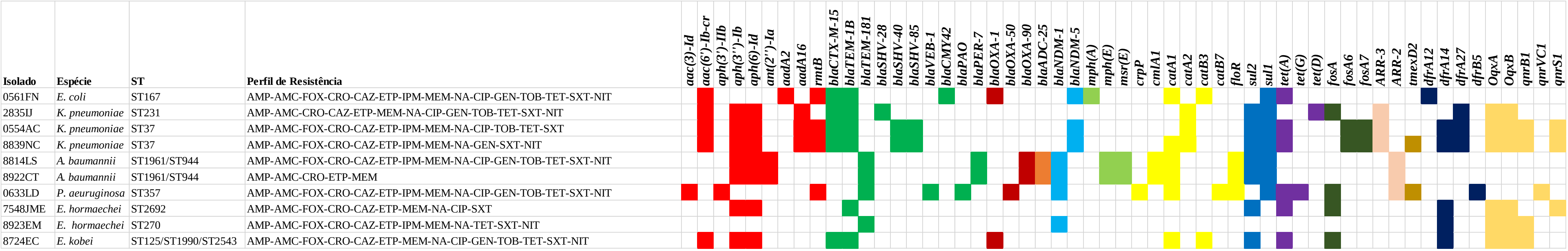


Figura 6. Distribuição dos genes de resistência antimicrobiana entre os isolados bacterianos analisados.

Legenda:

Aminoglicosídeos; Beta-lactâmicos; Beta-lactamase de classe C; Oxacilinases; Carbapenémicos; Fenicóis; Macrolídeos; Sulfonamidas; Tetraciclina; Trimetoprim; Fluoroquinolonas; Bombas de efluxo; Fosfomicinas; Rifamicinas.

11.6. Caracterização molecular de genes de virulência em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*

A análise genómica dos determinantes de virulência foi feita apenas para quatro (4) isolados bacterianos, sendo um *E. coli* e três *K. pneumoniae*. A análise destes isolados revelou a presença de um conjunto diversificado de factores associados à patogenicidade. No total foram identificadas 47 ocorrências de genes de virulência distribuídas por diferentes mecanismos patogénicos, incluindo adesão e/colonização (n=28), aquisição de ferro (n=9), invasão e evasão do sistema imunitário (n=8) e produção de toxinas (n=2) (Tabela 6).

Os genes associados à adesão e colonização constituíram o grupo mais frequente, representando 28 das 47 ocorrências (59,6%). No isolado de *E. coli* (0561 FN), foram detectados diferentes genes *aslA, csgA, fdeC, HRA, papA_F43, papC, yehB, yehC, yehD* e *yghJ*, todos associados à adesão às células do hospedeiro, colonização e formação de biofilme. Nos três isolados de *K. pneumoniae* (2835 IJ, 0554 AC e 8839 NC), foram identificados genes homologos aos de *E. coli*, responsáveis por codificar estruturas de superfície bacteriana envolvidas na ancoragem e colonização do hospedeiro, incluindo *yagY/ecpB, yagZ/ecpA, yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC* e *ykgK/ecpR*.

Os determinates relacionados com a aquisição de ferro, representam a segunda categoria mais abundante (9 das 47 ocorrências identificadas). O gene *entB* foi detectado nos três isolados de *K. pneumoniae* (2835 IJ, 0554 AC e 8839 NC), enquanto *entA* foi identificado em dois isolados de *K. pneumoniae* (0554 AC e 8839 NC). Adicionalmente, o gene *fepC*, associado ao transporte de sideróforos, foi encontrado nos três isolados de *K. pneumoniae* (2835 IJ, 0554 AC e 8839 NC). O gene *irp2*, relacionado com a biossíntese do sideróforo *yersiniabactina*, foi detetado exclusivamente no isolado de *E. coli* (0561 FN).

No que se refere aos mecanismos de evasão do sistema imunitário e invasão, foram identificadas 8 ocorrências (17,0%). No isolado de *E. coli* (0561 FN), foram detectados os genes *nlpI, shiB, capU, iss* e *traT*, responsáveis pela sobrevivência bacteriana, resistência à acção lítica do complemento e pela adaptação ao hospedeiro. Nos isolados de *K. pneumoniae* (2835 IJ, 0554 AC e 8839 NC), o gene *ompA* foi mapeado na totalidade de amostragem (3/3; 100%), sendo este determinante crucial para a manutenção da integridade da membrana externa, e evasão das defesas imunitárias.

Os genes relacionados com a produção de toxinas corresponderam a 2 das 47 ocorrências (4,3%) e foram observados exclusivamente no isolado de *E. coli* (0561 FN). Estes incluíram *astA*, responsável pela produção de uma enterotoxina termoestável, e *hlyE*, que codifica uma hemolisina associada à citotoxicidade celular.

Tabela 6. Caracterização molecular dos genes de virulência e sua classificação funcional em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*

Código do isolado	Espécie	Adesão / colonização	Aquisição de ferro	Invasão e evasão do sistema imunitário	Produção de toxinas	Total de genes de virulência
0561 FN	*E. coli*	*aslA, csgA, fdeC, HRA, papA_F43, papC, yehB, yehC, yehD, yghJ*	*irp2*	*nlpI, shiB, capU, iss, traT*	*astA, hlyE*	18
2835 IJ	*K. pneumoniae*	*yagY/ecpB, yagZ/ecpA, yagV/ecpE, yagW/ecpD,yagX/ecpC, ykgK/ecpR*	*entB, fepC*	*ompA*	Nenhum gene foi detectado	9
0554 AC	*K. pneumoniae*	*yagY/ecpB, yagZ/ecpA, yagV/ecpE, yagW/ecpD,yagX/ecpC, ykgK/ecpR*	*entA, entB, fepC*	*ompA*	Nenhum gene foi detectado	10
8839 NC	*K. pneumoniae*	*yagY/ecpB, yagZ/ecpA, yagV/ecpE, yagW/ecpD,yagX/ecpC, ykgK/ecpR*	*entA, entB, fepC*	*ompA*	Nenhum gene foi detectado	10

11.7. Relação entre os desfechos clínicos dos pacientes com o perfil fenotípico e molecular

Dos 16 pacientes internados na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) do Hospital Central de Maputo (HCM) com diagnóstico de sépsis causada por bactérias Gram-negativas, 9/16 (56,3%) evoluíram para óbito e 7/16 (43,7%) apresentaram

melhoria clínica. Dos 16 isolados, apenas 11 foram submetidos a sequenciação genómica completa, tendo sido analisados exclusivamente os isolados sequenciados. Todos os isolados bacterianos analisados apresentaram perfil de multirresistência (MDR), conforme demonstrado na Tabela 7.

O isolado *E. coli* ST167 (0561 FN) apresentou 18 genes de virulência, distribuídos entre adesão e colonização (n=10), aquisição de ferro (n=1), invasão e evasão do sistema imunitário (n=5) e produção de toxinas (n=2). Foram ainda identificados plasmídeos IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncI e IncN3. O isolado *E. coli* ST167 apresentou 14 genes de resistência e esteve associado a um caso tratado com ciprofloxacina, imipenem, fluconazol e piperacilina/tazobactam, que evoluiu para óbito.

O isolado *K. pneumoniae* ST231 (2835 IJ) com o tipo capsular K30 e o serótipo de O, O1αβ,2β, apresentou 9 genes de virulência, distribuídos entre adesão e colonização (n=6), aquisição de ferro (n=2) e invasão/evasão do sistema imunitário (n=1). Foram identificados os plasmídeos Col(pHAD28), IncFIB(K), IncFII(K) e IncR. Este isolado apresentou 18 genes de resistência e esteve associado a um paciente tratado com ceftriaxona, com desfecho de óbito. O isolado *K. pneumoniae* ST37 (0554 AC) com o tipo capsular K35 e o serótipo O, O3αβ, apresentou 10 genes de virulência, distribuídos entre adesão e colonização (n=6), aquisição de ferro (n=3) e invasão/evasão do sistema imunitário (n=1). Foram identificados os plasmídeos Col(pHAD28), IncFII(K), IncFIA(pBK30683), IncFIB(pNDM-Mar), IncHI1B(pNDM-MAR), RepB, repFIB e IncFIB(K)(pCAV1099-114), Este isolado apresentou 26 genes de resistência, tendo o paciente sido tratado com imipenem e apresentado melhoria clínica. O isolado *K. pneumoniae* ST37 (8839 NC) com o tipo capsular K35 e o serótipo O, O3αβ, apresentou 10 genes de virulência, distribuídos entre adesão e colonização (n=6), aquisição de ferro (n=3) e invasão/evasão do sistema imunitário (n=1). Foram identificados os plasmídeos IncFII(K), IncFIA(pBK30683), IncFIB(K)(pCAV1099-114), IncFIB(pNDM-Mar), IncHI1B(pNDM-MAR), RepB e repFIB. Este isolado apresentou 27 genes de resistência e esteve associado a um paciente tratado com piperacilina/tazobactam e ciprofloxacina, com desfecho de óbito. Para os restantes isolados sequenciados, não foi realizada a caracterização dos genes de virulência devido à indisponibilidade de plataformas específicas para detecção desses determinantes.

As estirpes de *E. hormaechei* ST270 (8923 EM), ST2692 (7548 JME) e *E. kobei* ST125/ST1990/ST2543 (8724 EC) apresentaram 9, 12 e 28 genes de resistência, respectivamente. O isolado (8923 EM) esteve associado a um paciente tratado com ceftriaxona, que apresentou melhoria clínica. Por sua vez, os isolados 7548 JME e 8724 EC estiveram associados a pacientes tratados com ceftriaxona, ampicilina e ceftriaxona, aciclovir, artesunato respectivamente, ambos evoluiram para óbito. O isolado com identificação da espécie inconclusiva (8769 EK) apresentou 4 genes de resistência e esteve associado a um paciente tratado com ceftriaxona e aciclovir, que apresentou melhoria clínica.

O isolado *P. aeruginosa* ST357 (0633 LD) apresentou 22 genes de resistência e esteve associado a um paciente tratado com piperacilina/tazobactam e ciprofloxacina, que evoluiu para óbito.

Os isolados de *A. baumannii* ST1961/ST944 (8814 LS) e ST196/ST944 (8922 CT) apresentaram, ambos, o tipo capsular K155, o serótipo de lipopolissacarídeo (O) OC1 e 17 genes de resistência. O paciente associado ao isolado 8814 LS foi tratado com piperacilina/tazobactam e ceftriaxona, enquanto o associado ao isolado 8922 CT recebeu ceftriaxona. Em ambos os casos se observou melhoria clínica.

Tabela 7. Relação entre o desfecho clínico dos pacientes e as características fenotípicas e moleculares dos isolados bacterianos.

Código do isolado	Espécie	Sequence type	Nº genes de virulência	Nº genes de resistência	Tratamento durante o internamento	Desfecho clínico
0561 FN	*E. coli*	ST167	18	14	Piperacilina/Tazobactam, Imipenem, Ciprofloxacina e Fluconazol	Óbito
2835 IJ	*K. pneumoniae*	ST231	9	18	Ceftriaxona	Óbito
0554 AC	*K. pneumoniae*	ST37	10	26	Imipenem	Melhoria clínica
8839 NC	*K. pneumoniae*	ST37	10	27	Piperaciclina Tazobactam e Ciprofloxacina	Óbito
0633 LD	*P. aeruginosa*	ST357	ND	22	Piperaciclina Tazobactam e Ciprofloxacina	Óbito
7548 JME	*E. hormaechei*	ST2692	ND	12	Ceftriaxona e Ampicilina	Óbito

8923 EM	*E. hormaechei*	ST270	ND	9	Ceftriaxona	Melhoria clínica
8724 EC	*E. kobei*	ST125 /ST19 90/ST 2543	ND	28	Ceftriaxona, Aciclovir e Artesunato	Óbito
8814 LS	*A. baumannii*	ST196 1/ST9 44	ND	17	Piperaciclina Tazobactam e Ceftriaxona	Melhoria clínica
8769 EK	Identificação inconclusiva	ND	ND	4	Ceftriaxona e Aciclovir	Melhoria clínica
8922 CT	*A. baumannii*	ST196 1/ST9 44	ND	17	Ceftriaxona	Melhoria clínica
Total	11 isolados	9	47	194	-	6 óbitos

Legenda: ND = não determinado.

12. Discussão

12.1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com sépsis provenientes da UCIP-HCM entre Janeiro e Dezembro de 2023

O presente estudo teve como objectivo analisar o perfil fenotípico e molecular de bactérias Gram-negativas isoladas em hemoculturas e os desfechos clínicos dos pacientes internados na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do Hospital Central de Maputo (UCIP-HCM), entre Janeiro e Dezembro de 2023. A sépsis mantém-se, ainda hoje, como uma das principais causas de morbilidade e mortalidade na população infantil com idade inferior a cinco anos, com particular incidência nos países de baixo e médio rendimento. Nestas regiões, a elevada prevalência de doenças infecciosas, agravada pelo acesso restrito a serviços de saúde, pelo diagnóstico tardio e pela dificuldade no acesso a terapêuticas adequadas, constitui um factor determinante para a mortalidade infantil (WHO, 2020; Watson *et al*., 2024; Dicko *et al*., 2026).

Nos pacientes avaliados verificou-se um ligeiro predomínio do sexo masculino correspondendo a 9/16 (56%) da amostra. A consistência destes resultados com os dados reportados em diferentes contextos sugere que o ligeiro predomínio dos pacientes do sexo masculino observado no presente estudo poderá reflectir uma tendência também descrita na sépsis pediátrica. Este padrão tem sido documentado em estudos realizados em Moçambique, na Tanzânia e em diferentes regiões do mundo, nos quais se observou uma proporção ligeiramente superior de pacientes do sexo masculino entre as crianças com bacteriemia e sépsis (Garrine *et al.*, 2023; Godfrey *et al.*, 2022; Kennedy *et al.*, 2025).

A consistência destes resultados reforça que o ligeiro predomínio do sexo masculino é um padrão epidemiológico global na sépsis pediátrica, onde pacientes do sexo masculino tendem a apresentar uma incidência ligeiramente superior de infecções graves (Klein & Flanagan, 2016; Fleischmann-Struzek *et al*., 2018; Weiss *et al*., 2020; Gubbels Bupp, 2021). Esta diferença poderá estar relacionada com factores biológicos e genéticos que influenciam a resposta imunitária (Klein & Flanagan, 2016; Gubbels Bupp, 2021). O cromossoma X contém numerosos genes envolvidos na imunidade e, em geral, o sexo feminino desenvolve respostas imunitárias inatas e adaptativas mais eficazes, o que pode conferir maior protecção contra infecções graves, mesmo durante a infância, apesar de as diferenças hormonais serem menos marcadas antes da puberdade (Klein & Flanagan, 2016; Gubbels Bupp, 2021).

Todos os pacientes incluídos tinham menos de cinco anos, o que reitera a elevada vulnerabilidade desta faixa etária à sépsis pediátrica. Ademais, observou-se uma distribuição equitativa entre lactentes (infantis com menos de 12 meses, incluindo um neonato) e crianças entre 13 e 60 meses, representando cada grupo 50% dos casos, sendo apenas um correspondente ao período neonatal. Em Moçambique, Sigauque *et al*., (2009), em um estudo feito no Distrito de Manhiça a cerca de 70 Km da cidade de Maputo, identificaram infecção da corrente sanguínea em 8% (1.550/19.896) das admissões pediátricas. Os autores demonstraram que a incidência de bacteriemia adquirida na comunidade foi mais elevada em crianças com menos de um ano (1.730 casos por 100.000 crianças-ano), reduzindo para 782/100.000 entre crianças de 1 a 4 anos e para apenas 49/100.000 nas crianças com cinco ou mais anos. Recentemente, na mesma região, Manhiça, Garrine *et al*., (2023), verificaram que 7,6% (3.197/41.891) das crianças internadas apresentavam bacteriemia, com a maior incidência registada no período neonatal (589,8 episódios por 100.000 crianças-ano). Essa tendência também é descrita no plano regional. Na Tanzânia, Godfrey *et al*., (2022) observaram que 79,6% (195/245) das crianças internadas com sépsis tinham menos de cinco anos, com idade mediana de dois anos (IIQ: 10 meses–4 anos). Resultados semelhantes aos do presente estudo também foram descritos no Quénia por Berkley *et al*., (2005), que estimaram uma incidência anual mínima de bacteriemia adquirida na comunidade de 1.457 casos por 100.000 crianças com menos de um ano, decrescendo para 1.080 por 100.000 em menores de dois anos e 505 por 100.000 em menores de cinco anos. Em conjunto, estes estudos achados corroboram que sépsis e outras infecções bacterianas invasivas afectam predominantemente crianças nos primeiros anos de vida. Este cenário reflete a imaturidade do sistema imunitário na infância, a maior exposição a agentes infecciosos e a elevada frequência de factores predisponentes, como prematuridade, desnutrição e cobertura vacinal incompleta (Weiss *et al*., 2020; WHO, 2020).

Por constituir um critério de elegibilidade do presente estudo, todos os pacientes incluídos apresentavam diagnóstico clínico de sépsis à admissão na UCIP do HCM, uma vez que este foi o principal critério de inclusão no presente estudo. Embora a frequência de sépsis corresponda a 100%, não representa a incidência geral de sépsis na unidade, os achados reiteram a centralidade desta síndrome como um dos principais motivos de hospitalização e de infecção grave em UCIP. Em Moçambique, Punchak *et al*., (2018), num estudo realizado na UCIP do HCM, verificaram que a sépsis esteve entre os diagnósticos mais

frequentes de admissão na unidade, refletindo a elevada carga desta síndrome em crianças criticamente doentes. Adicionalmente, Mandomando *et al*., (2010) e Kenga *et al*., (2021) reforçaram que as infecções bacterianas invasivas, principalmente a sépsis, a bacteriemia, a meningite bacteriana e a pneumonia, representam uma importante causa de hospitalização pediátrica em Moçambique. Este panorama de elevada pressão assistencial em ambiente hospitalar terciário também é observado na região subsaariana. Na Tanzânia, Godfrey *et al*., (2022) avaliaram 245 crianças internadas com sépsis no Hospital Nacional Muhimbili, confirmando o forte impacto da síndrome em unidades terciárias pediátricas. Estes resultados acompanham as estimativas da OMS, que reconhece a sépsis como uma das principais causas de doença grave em crianças, particularmente em países de baixo e médio rendimento, onde persistem desafios relacionados com o diagnóstico atempado, acesso aos cuidados intensivos e terapêutica antimicrobiana adequada (WHO, 2020).

A nível global, estudos realizados em diferentes continentes, incluindo América do Norte, Europa, Ásia e Oceânia, evidenciam que a carga da sépsis pediátrica continua elevada, reforçando a necessidade de estratégias abrangentes que congreguem a prevenção, o diagnóstico oportuno e a terapêutica eficaz (Fleischmann-Struzek *et al*., 2020; Weiss *et al*., 2020).

Em conjunto, as características demográficas e clínicas observadas neste estudo acompanham o perfil epidemiológico descrito em Moçambique e noutros países africanos, caracterizado pelo predomínio da sépsis em crianças menores de cinco anos, sobretudo em crianças do sexo masculino. As diferenças observadas entre os estudos podem refletir variações na população estudada, na epidemiologia local, critérios de inclusão, acesso aos cuidados de saúde e metodologias utilizadas para a definição e diagnóstico da sépsis (Singer *et al*., 2016; Weiss *et al*., 2020; WHO, 2024).

12.2. Frequência de espécies de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de hemocultura provenientes da UCIP-HCM entre Janeiro e Dezembro de 2023

As BGN constituem importantes agentes etiológicos de infecções da corrente sanguínea em crianças hospitalizadas, particularmente em UCIP, onde estão associadas a elevada gravidade clínica, maior necessidade de suporte intensivo e aumento do risco de complicações (WHO, 2024; Watson *et al*., 2024; Weiss *et al*., 2020).

No pressente estudo foram identificadas 16 BGN incluindo *K. pneumoniae, E. coli* e *Enterobacter* spp., bem como bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, frequentemente descritos entre os principais agentes de infecções invasivas pediátricas em diferentes contextos hospitalares (Berkley *et al*., 2005; Fleischmann-Struzek *et al*., 2020; WHO, 2024).

A distribuição das espécies identificadas neste estudo revelou predomínio de *Klebsiella* spp. (31,3%), seguida de *Enterobacter* spp. (25%) e *A. baumannii* (12,5%) entre os isolados provenientes de hemoculturas da UCIP do HCM. Em Moçambique, estudos realizados em crianças hospitalizadas demonstram a relevância das infecções bacterianas invasivas causadas por bacilos Gram-negativos. No Distrito de Manhiça, Sigauque *et al*., (2009), identificaram diferentes espécies Gram-negativas entre os agentes associados à bacteriemia adquirida na comunidade em crianças, incluindo *E. coli* (10%, 157/1550), *Enterobacter* spp. (1%, 20/1550), *Klebsiella* spp. (1%, 12/1550) e *Pseudomonas* spp. (1%, 10/1550). Recentemente, no mesmo contexto, Massinga *et al*., (2021) analisaram 52.968 crianças menores de cinco anos submetidas a vigilância de doença bacteriana invasiva, tendo identificado *Klebsiella* spp. em (2,1%, 88/4270) das hemoculturas positivas, sendo *K. pneumoniae* a espécie predominante (72,7%, 64/88). No HCM, Sumbana *et al*., (2021) também demonstraram a importância das BGN em infecções da corrente sanguínea, tendo identificado *K. pneumoniae* como a espécie mais frequentemente isolada de sangue (26/128, 20,3%), seguida de *E. coli* (19/128, 14,8%) e *Enterobacter* spp. (5/128, 3,9%). Estes resultados reforçam a relevância de *Klebsiella* spp. como um dos principais agentes associados às infecções invasivas pediátricas em Moçambique.

Em ambiente hospitalar, particularmente em UCIP, a predominância de *Klebsiella* spp. observada neste estudo é consistente com o padrão descrito em outros países africanos. Na Tanzânia, Godfrey *et al*., (2022), num estudo realizado no Hospital Nacional Muhimbili envolvendo 245 crianças com sépsis, identificaram crescimento bacteriano em 29,8% dos casos, sendo os principais bacilos Gram-negativos isolados *E. coli* (12,3%), *Klebsiella* spp. (6,8%) e *P. aeruginosa* (5,5%). Recentemente, Moyo *et al*., (2025), também na Tanzânia, analisaram 135 bactérias Gram-negativas isoladas de hemoculturas pediátricas e observaram predomínio de *K. pneumoniae* (45,9%, 62/135), seguida de *E. coli* (20,7%, 28/135), *A. baumannii* (7,4%, 10/135) e *E. cloacae* (3,7%, 5/135).

No Quénia, Berkley *et al*., (2005), demonstraram igualmente a circulação de bactérias Gram-negativas em crianças com bacteriemia adquirida na comunidade, incluindo *E. coli* (10%, 157/1550), *Enterobacter* spp. (1%, 20/1550), *Klebsiella* spp. (1%, 12/1550) e *Pseudomonas* spp. (1%, 10/1550). Na África do Sul, estudos realizados em unidades pediátricas e neonatais também descrevem *K. pneumoniae, A. baumannii* e *P. aeruginosa* entre os principais agentes associados às infecções hospitalares invasivas (Dramowski *et al*., 2021).

A identificação de *Cronobacter* spp. neste estudo constitui um achado relevante, considerando a capacidade deste género bacteriano de causar infecções invasivas da corrente sanguínea, particularmente em recém-nascidos e crianças pequenas. Casos de bacteriemia por *Cronobacter* spp. confirmados por hemocultura foram descritos em diferentes países, incluindo Estados Unidos, Brasil, China e Japão, principalmente associados a populações pediátricas vulneráveis (Joseph *et al*., 2012; Holy & Forsythe, 2014). Embora os relatos em África sejam menos frequentes, a ocorrência deste agente em infecções invasivas pediátricas reforça a importância da sua inclusão na vigilância microbiológica hospitalar (Iversen *et al*., 2008). Assim, a identificação deste microorganismo em hemocultura no contexto pediátrico do HCM contribui para ampliar o conhecimento sobre os agentes Gram-negativos envolvidos em infecções invasivas em crianças em Moçambique.

A frequência de espécies Gram-negativas observada neste estudo é, portanto, concordante com o perfil descrito em Moçambique, África e noutras regiões do mundo, onde as Enterobacterales, particularmente *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., permanecem entre os principais agentes associados às infecções invasivas pediátricas. As diferenças observadas entre estudos podem ser explicadas provavelmente por variações na população estudada, características das unidades hospitalares, epidemiologia local, práticas de controlo de infecções e métodos utilizados para identificação bacteriana (WHO, 2024).

12.3. Comparação do resultado da identificação da espécie de bactérias Gram-negativas de isolados de amostras de hemocultura obtido por métodos bioquímicos com a análise genómica *in silico*

A identificação precisa dos agentes etiológicos da sépsis constitui um dos pilares do diagnóstico microbiológico das infecções, permitindo orientar a terapêutica

antimicrobiana, apoiar a vigilância epidemiológica e monitorizar a disseminação de clones bacterianos e genes de resistência (Didelot *et al*., 2012; Ellington *et al*., 2017). Embora os métodos fenotípicos continuem amplamente utilizados na rotina laboratorial em virtude do seu reduzido custo e da sua fácil aplicação (Janda & Abbott, 2007), o sequenciamento do genoma completo (*Whole Genome Sequencing* – WGS) tem emergido como uma ferramenta de elevada resolução para identificação bacteriana, permitindo discriminar espécies filogeneticamente muito próximas (Didelot *et al*., 2012).

Dos 16 isolados inicialmente identificados por métodos bioquímicos, foi possível realizar a análise genómica *in silico* em 11 (68,8%). A identificação conclusiva da espécie em 10 dos 11 isolados analisados (90,9%), demonstrou elevado desempenho da abordagem genómica. A concordância entre a identificação bioquímica e a análise *in silico* foi observada em seis isolados (54,5%).

Em Moçambique, a utilização de abordagens genómicas para identificação bacteriana ainda permanece limitada, existindo poucos estudos que aplicaram sequenciamento do genoma completo em isolados clínicos. Sumbana, (2019), no estudo de caracterização molecular abrangente de bactérias Gram-negativas invasivas realizado em Moçambique, aplicaram uma abordagem combinando métodos fenotípicos, PCR e WGS em 159 isolados provenientes de diferentes hospitais do País, incluindo o HCM. Embora o estudo de Sumbana, (2019) não tenha avaliado directamente a concordância entre métodos convencionais e WGS, os seus resultados demonstram a utilidade da caracterização genómica para discriminar espécies clinicamente relevantes e identificar determinantes associados à resistência antimicrobiana. Esta técnica permitiu a detecção de linhagens específicas, incluindo *Enterobacter* spp., *A. baumannii* e *K. pneumoniae* portadoras de perfis de resistência complexos demostrando que o valor do WGS é crucial para vigilância microbiológica em contextos onde métodos convencionais apresentam limitações.

Semelhantemente, estudo conduzido por Santona *et al*., (2022), também em Moçambique, demonstraram a aplicabilidade do WGS na caracterização de *E. coli* associada a infecções extraintestinais provenientes do HCM, permitindo identificar linhagens bacterianas circulantes, genes de resistência e componentes genéticos móveis implicados na propagação da resistência aos antimicrobianos. Estes dados reforçam que

a aplicação de ferramentas genómicas em laboratórios de referência pode contribuir significativamente para melhorar a vigilância epidemiológica nacional.

Nos Estados Unidos da América, Salipante *et al*., (2015), avaliaram o desempenho do WGS na identificação bacteriana e observaram elevada concordância taxonómica, com 99% (123/124) dos isolados identificados ao nível do género e 79% (98/124) ao nível da espécie utilizando análise genómica. Num conjunto adicional de validação bacteriana, os autores obtiveram identificação ao nível do género em 100% dos isolados e identificação ao nível da espécie em 89% (79/89), demonstrando que o WGS apresenta elevada capacidade de resolução, embora algumas limitações possam ocorrer dependendo da qualidade das sequências, cobertura genómica e disponibilidade de genomas de referência. Estes valores são comparáveis aos observados no presente estudo, onde 90,91% dos isolados sequenciados foram identificados ao nível da espécie.

A discrepância observada entre identificação bioquímica e genómica no presente estudo, particularmente entre isolados inicialmente classificados como *E. cloacae* e posteriormente identificados como *E. hormaechei* e *E. kobei*, foi semelhante em estudos realizados em ambientes hospitalares neonatais, na Índia, Manandhar *et al.*, (2022) que investigaram um surto causado por *E. kobei* numa unidade de cuidados intensivos neonatais e demonstraram que isolados inicialmente identificados como *Enterobacter* spp. por métodos convencionais foram posteriormente diferenciados por análise genómica. Durante o período do surto, 14 isolados inicialmente considerados *Enterobacter* spp. foram confirmados como *E. kobei* através de análise taxonómica baseada no genoma completo, evidenciando a dificuldade dos métodos fenotípicos em distinguir espécies estreitamente relacionadas (Manandhar *et al.*, 2022). Esta discrepância pode ser explicada pela maior capacidade do WGS em diferenciar organismos pertencentes a grupos taxonomicamente próximos (Davin-Regli *et al*., 2019).

A análise genómica permitiu igualmente resolver dois casos classificados como de baixa discriminação pelo sistema API 20E, identificando-os conclusivamente como *A. baumannii* e *E. hormaechei*. Estes resultados reforçam a complementaridade entre métodos fenotípicos e genómicos, uma vez que sistemas bioquímicos comerciais podem apresentar limitações na identificação de microrganismos com características metabólicas semelhantes ou pouco representados nas bases de dados utilizadas (Garza-González *et al.*, 2020). Estudos realizados em diferentes regiões do mundo demonstram que a

utilização do WGS como método complementar melhora significativamente a identificação de isolados inicialmente classificados como "baixa discriminação" ou "identificação duvidosa" por métodos convencionais (Salipante *et al.*, 2015).

Relativamente à análise genómica, embora esta tenha permitido resolver a maioria dos casos de baixa discriminação, um isolado permaneceu sem identificação conclusiva após a análise genómica, tendo sido atribuídas simultaneamente as espécies *Staphylococcus saprophyticus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. Apesar deste resultado, o isolado apresentou crescimento em meio MacConkey e coloração de Gram compatível com bacilos Gram-negativos, características microbiológicas que não sustentam a identificação de *S. saprophyticus*, um coco Gram-positivo. A atribuição simultânea de diferentes espécies pode estar relacionada com limitações inerentes à análise bioinformática, incluindo regiões genómicas altamente conservadas, cobertura insuficiente de determinadas regiões do genoma, qualidade da montagem (*assembly*), presença de contigs fragmentados ou limitações das bases de dados utilizadas para classificação taxonómica (Schwengers *et al.*, 2021).

Situações semelhantes têm sido descritas em estudos que utilizam WGS para identificação bacteriana, nos quais a integração entre resultados genómicos e dados microbiológicos convencionais é recomendada para aumentar a robustez da interpretação e evitar classificações incorretas baseadas exclusivamente na análise computacional (Chun *et al.*, 2018; Loman & Watson, 2013).

Importa ainda referir que este isolado apresentava reduzida viabilidade microbiológica, perdendo rapidamente a capacidade de crescimento após sucessivas repicagens em meio de cultura. A diminuição da viabilidade bacteriana pode comprometer a obtenção de biomassa adequada para análises complementares e influenciar a qualidade do DNA extraído, particularmente em isolados submetidos a armazenamento prolongado ou múltiplas passagens laboratoriais (Besser *et al.*, 2018). Este fenómeno pode contribuir para resultados genómicos menos resolutivos devido à redução da qualidade ou representatividade do material genético sequenciado, sem comprometer a fiabilidade global do WGS quando aplicados critérios adequados de controlo de qualidade (Schwengers *et al.*, 2021).

12.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias Gram-negativas

A resistência aos antimicrobianos por parte de BGN configura-se, na actualidade, como um dos principais desafios à saúde pública em todo o mundo, com particular incidência nas unidades de cuidados intensivos pediátricos, onde o uso recorrente de antibióticos de largo espectro cria condições favoráveis à selecção de estirpes multirresistentes (Tacconelli *et al*., 2018; Murray *et al*., 2022). A Organização Mundial da Saúde assinala a *K. pneumoniae*, o *A. baumannii*, a *P. aeruginosa* e as espécies do género *Enterobacter* como agentes prioritários, em virtude do agravamento dos níveis de resistência observados face às cefalosporinas de terceira geração e aos carbapenémicos (WHO, 2024).

No presente estudo, todos os 16 isolados (100%) exibiram um fenótipo de multirresistência (MDR), caracterizado pela ausência de susceptibilidade a, no mínimo, um fármaco em três ou mais grupos terapêuticos, o que reflecte um contexto de forte pressão selectiva na UCIP-HCM. Esta frequência foi superior à reportada em outros estudos realizados em Moçambique. Sumbana, (2019) verificaram que 72% (18/25) dos isolados de *E. coli* extraintestinais eram MDR, 80% (28/35) dos isolados de *K. pneumoniae*, 80% (4/5) de *Enterobacter spp.*, 84% (21/25) de *A. baumannii* e 58% (11/19) de *Pseudomonas spp.* apresentavam igualmente perfil de multirresistência. De forma semelhante, Massinga *et al*., (2021) observaram que 66,7% (74/111) dos isolados de *Klebsiella spp.* recuperados de crianças internadas em Moçambique eram MDR, enquanto Sumbana *et al*., (2023) confirmaram multirresistência em 80% (28/35) dos isolados de *K. pneumoniae*. Estes resultados demonstram a presença de BGN multirresistentes em diferentes unidades hospitalares e populações pediátricas de Moçambique.

Resultados semelhantes têm sido descritos em diferentes países africanos. Na África do Sul, Dramowski *et al*., (2021a) verificaram que 80,6% (25/31) dos isolados de *K. pneumoniae*, 85,7% (6/7) de *A. baumannii*, 33,3% (3/9) de *E. cloacae* e 19,0% (4/21) de *S. marcescens* eram multirresistentes. Num estudo multicêntrico envolvendo hospitais africanos, Dramowski *et al*., (2021b) observaram ainda resistência às cefalosporinas de terceira geração em 63% das bacteriemias por *K. pneumoniae*, variando entre 53% e 77% conforme o país. Na Tanzânia, Godfrey *et al*., (2022) observaram uma elevada frequência

de resistência entre BGN, incluindo uma taxa de resistência de 80% para a ampicilina em *Klebsiella* spp.**,** 60% à amoxicilina/ácido clavulânico e gentamicina, e 40% à ceftriaxona e ciprofloxacina. Na Etiópia, Tufa *et al*. (2022) verificaram resistência de 88,9% à cefotaxima, 74,1% à ceftazidima, 70,4% à ciprofloxacina e 63,0% à gentamicina entre isolados Gram-negativos provenientes de hemoculturas.

Resultados comparáveis também foram observados fora de África. No Nepal, Parajuli *et al.*, (2017) verificaram resistência de 100% das BGN às cefalosporinas de terceira geração, sendo que *Klebsiella* spp. apresentou resistência de 86,4% à ciprofloxacina, 83,7% à gentamicina, 81,0% à piperacilina-tazobactam e 48,6% ao imipenem. No Peru, Krapp *et al*., (2023) analisaram 449 isolados de BGN provenientes de infecções da corrente sanguínea e observaram que 69,0% foram MDR, 59,2% eram resistentes às cefalosporinas de terceira geração, 63,5% às fluoroquinolonas e 16,5% aos carbapenémicos. A resistência aos carbapenémicos atingiu 60,8% em *Acinetobacter* spp. e 37,0% em *P. aeruginosa*, reforçando o aumento global da resistência entre patógenos hospitalares.

No presente estudo, o único isolado de *E. coli* apresentou resistência a 100% dos antimicrobianos testados, incluindo β-lactâmicos, carbapenémicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, caracterizando um perfil extremo de multirresistência. Embora represente apenas um isolado, este perfil foi mais grave do que o descrito por Sumbana, (2019), que observaram resistência de 88% ao sulfametoxazol-trimetoprim, 84% à amoxicilina/ácido clavulânico, 68% às cefalosporinas de terceira geração, 60% à gentamicina e apenas 4% ao meropenem entre isolados de *E. coli* extraintestinais. De forma semelhante, Godfrey *et al*., (2022) encontraram resistência de 89% à ampicilina, 66,7% à ceftriaxona, 44,4% à ciprofloxacina e apenas 33,3% ao meropenem.

Os isolados de *Klebsiella spp.* apresentaram resistência de 100% aos β-lactâmicos testados, incluindo cefalosporinas de terceira geração e carbapenémicos, bem como ao sulfametoxazol-trimetoprim, mantendo susceptibilidade apenas parcial ao imipenem, gentamicina e tobramicina (40%). Estes resultados demonstram um perfil de resistência superior ao observado em Moçambique por Sumbana, (2019), que reportaram resistência entre 74% e 83% aos β-lactâmicos e aminoglicosídeos, mas susceptibilidade de 100% aos carbapenémicos. De forma semelhante, Sumbana *et al*., (2023) encontraram resistência de 82,8% à amoxicilina/ácido clavulânico, 77% à cefotaxima, ceftazidima e

sulfametoxazol-trimetoprim, 74,3% à gentamicina e susceptibilidade completa aos carbapenémicos. Estudo anterior realizado no Hospital Distrital da Manhiça observou igualmente elevada resistência à ampicilina (92,7%), gentamicina (54,1%) e ceftriaxona (53,1%), enquanto apenas 8% dos isolados apresentavam diminuição da susceptibilidade ao meropenem (Massinga *et al*., 2021). Um estudo rerealizado em Portugal, observou que isolados produtores de ESBL apresentavam resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim, 91,7% à tobramicina e 75% à gentamicina, demonstrando um padrão semelhante de resistência múltipla, embora com menor envolvimento dos carbapenémicos (Carvalho *et al*., 2021).

Os quatro isolados de *Enterobacter* spp. foram 100% resistentes aos β-lactâmicos avaliados, incluindo ertapenem e meropenem, bem como ao ácido nalidíxico e sulfametoxazol-trimetoprim, mantendo maior susceptibilidade à gentamicina (75%) e ao imipenem e tobramicina (50%). Estes resultados revelam um elevado perfil de resistência relativamente ao reportado por Sumbana, (2019).

Os dois isolados de *A. baumannii* foram 100% resistentes aos β-lactâmicos testados, incluindo meropenem, permanecendo apenas um dos isolados susceptível ao imipenem, cefoxitina e a alguns antimicrobianos não β-lactâmicos. Estes resultados corroboram com os descritos por Sumbana, (2019), que observaram resistência de 96% ao sulfametoxazol-trimetoprim, 92% à gentamicina, 76% à ciprofloxacina e 44% ao meropenem, sendo 84% dos isolados classificados como MDR. No Peru, Krapp *et al*., (2023) reportaram resistência aos carbapenémicos em 60,8% dos isolados de *Acinetobacter* spp. enquanto Parajuli *et al*., (2017), observaram resistência aos carbapenémicos em 86,4% dos isolados de *Acinetobacter spp.* provenientes de unidades de cuidados intensivos.

O isolado de *P. aeruginosa* foi 100% resistente aos antimicrobianos testados, evidenciando um perfil de multirresistência extrema. Embora baseado num único isolado, este perfil foi superior ao descrito por Sumbana, (2019), que reportaram resistência de 63% à piperacilina-tazobactam e ceftazidima, 47% ao meropenem, 42% à gentamicina e ciprofloxacina, mantendo susceptibilidade completa à colistina, mostrando a importância da continua vigilância no País. No Peru, Krapp *et al*., (2023), observaram resistência aos carbapenémicos em 37% dos isolados de *P. aeruginosa*, enquanto Parajuli *et al*., (2017) encontraram resistência de 92% às cefalosporinas e 62,5% aos carbapenémicos.

No presente estudo, *Cronobacter* spp. revelou um padrão de resistência elevado, diferindo dos padrões geralmente descritos na literatura. Holý *et al*., (2019), avaliando 52 isolados clínicos de *Cronobacter* spp., observaram susceptibilidade de 100% aos antimicrobianos testados, incluindo β-lactâmicos, aminoglicosídeos, carbapenémicos e fluoroquinolonas. Entretanto, estudos realizados na China demonstram que este género apresenta capacidade de adquirir determinantes de resistência antimicrobiana. Li *et al*., (2023) identificaram resistência a diferentes agentes antimicrobianos entre isolados de *Cronobacter* spp., particularmente β-lactâmicos, além da presença de características genéticas associadas à resistência. Embora estes estudos tenham sido realizados em matrizes alimentares e não em isolados clínicos, estes dados enfatizam o papel que *Cronobacter* spp. pode desempenhar como repositório de genes associados à resistência antimicrobiana. Assim, o perfil observado no presente estudo, caracterizado por resistência generalizada e apenas susceptibilidade intermédia à ciprofloxacina, destaca a importância da vigilância deste patógeno em unidades pediátricas, especialmente devido à sua associação com infecções graves em recém-nascidos e crianças.

12.5. Caracterização molecular dos isolados de bactérias Gram-negativas

A análise do perfil molecular dos isolados revelou a presença na UCIP de múltiplos determinantes de resistência associados a diferentes tipos de antibióticos, incluindo β-lactâmicos, carbapenémicos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, trimetoprim, macrólidos, fenicóis, rifamicinas e fosfomicina, demonstrando a elevada carga genética de resistência detectados entre as estirpes Gram-negativas analisados, reflectindo a coexistência de múltiplos mecanismos moleculares de resistência, fenómeno amplamente descrito em bactérias multirresistentes isoladas em ambiente hospitalar (Jian *et al*., 2021).

Paralelamente, a análise de virulência, realizada apenas nos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* por limitação das ferramentas bioinformáticas disponíveis para as restantes espécies, revelou múltiplos genes de virulência pertencentes a diferentes categorias funcionais. Nos quatro isolados analisados, a presença de genes relacionados com mecanismos de adesão, aquisição de nutrientes, evasão imunitária e produção de toxinas evidencia a diversidade de factores de virulência identificados nestes isolados, os quais

podem contribuir para a colonização e persistência bacteriana no hospedeiro (Johnson & Russo, 2002; Paczosa & Mecsas, 2016; Sumbana *et al*., 2023).

O isolado de *E. coli* ST167 apresentou um perfil molecular que combina uma elevada carga de resistência e virulência. No que concerne à resistência, detectou-se os determinantes *bla*CTX-M-15 e *bla*NDM-5 (β-lactâmicos e carbapenémicos), *aac(6')-Ib-cr* e *rmtB* (aminoglicosídeos), *sul1* (sulfonamidas) e *tet(A)* (tetraciclinas). A coexistência de *bla*CTX-M-15 e *bla*NDM-5 é particularmente relevante, dado que limita consideravelmente as alternativas terapêuticas disponíveis (Linkevicius *et al*., 2023; Xia *et al*., 2024). Paralelamente, o isolado apresentou múltiplos genes de virulência, com predomínio dos associados à adesão e colonização (28 ocorrências), incluindo *aslA, csgA, fdeC, HRA, papA_F43, papC, yehB, yehC, yehD e yghJ.* Foram ainda detetados genes de aquisição de ferro, com destaque para *irp2* (yersiniabactina), e de evasão imunitária (*nlpI*, *shiB*, *capU*, *iss*, *traT*), bem como os genes de toxinas *astA* (enterotoxina termoestável) e *hlyE* (hemolisina).

Este perfil está em consonância com estudos realizados em Moçambique e noutros países, onde isolados clínicos de *E. coli* frequentemente acumulam diversos determinantes de resistência e virulência, aumentando a sua capacidade de causar infecções invasivas (Sumbana *et al*., 2021; Sumbana *et al*., 2023). Em Moçambique, Sumbana *et al*., (2021) identificaram num isolado de *E. coli* ST405, distinto do ST167 do presente estudo, um perfil de resistência semelhante (*bla*CTX-M-15, *bla*NDM-5, *rmtB*, *sul1*) e genes de virulência como *papA*, *hra*, *csgB*, *traT*, *ompA*, *irp1*, *irp2* e *fyuA*. A nível internacional, Linkevicius *et al*., (2023) reportaram o ST167 em 17,2% dos isolados portadores de *bla*NDM-5 na Europa, com *bla*CTX-M-15 em 68,8%, *aac(6')-Ib-cr* em 39,4% e *rmtB* em 24,6%. No Paquistão, Mujahid *et al*., (2024) verificaram elevadas frequências de *bla*CTX-M-15 (82,2%), *bla*NDM-5 (72,9%), incluindo os genes *aac(6')-Ib* (77,1%), *rmtB* (18,6%), *sul1* (88,1%) e *tetA* (38,1%) em *E. coli*, sendo o ST167 o segundo ST mais frequente (21,2%). Na China, Xia *et al*., (2024) observaram *bla*NDM-5 como a variante mais frequente (74,1%), com o ST167 predominante (17,2%). Relativamente aos genes de virulência, Kumar *et al*., (2025), na Índia, identificaram *HRA* em 33,3%, *papA_F43* em 5,5%, *papC* em 11,1%, *iss* em 38,8%, *capU* em 27,7% e *ompT* em 38,8% dos genomas de *E. coli* analisados. Em Moçambique, Massinga *et al*., (2021) verificaram que o gene *traT* estava presente em

10,2% dos isolados de crianças internadas e em 60,8% dos isolados pós-morte, sugerindo que genes de evasão imunitária podem contribuir para maior gravidade clínica.

Estes dados reforçam a importância epidemiológica do isolado de *E. coli* ST167 em infecções invasivas, uma vez que a associação entre múltiplos genes de resistência e virulência favorece a emergência de linhagens multirresistentes com potencial de disseminação através de elementos genéticos móveis (Linkevicius *et al*., 2023; Xia *et al*., 2024; Massinga *et al*., 2021; D'Onofrio *et al*., 2023).

Os isolados de *K. pneumoniae* ST231 e ST37 apresentaram um perfil molecular que combina uma elevada carga de resistência e virulência. No que concerne à resistência, foram identificados genes associados aos β-lactâmicos e carbapenémicos (*bla*TEM-1B, *bla*CTX-M-15, *bla*SHV e *bla*NDM-5), aminoglicosídeos (*aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*), quinolonas (*qnrB1* e *qnrS1*), sulfonamidas (*sul1* e *sul2*) e tetraciclinas (*tet(A)* e *tet(D)*). A identificação simultânea de genes ESBL (*bla*CTX-M-15, *bla*TEM, *bla*SHV) e carbapenemase (*bla*NDM-5) demonstra um elevado potencial de resistência, conferindo resistência a importantes grupos terapêuticos (Sumbana *et al*., 2023; Linkevicius *et al*., 2023). Paralelamente, os isolados apresentaram múltiplos genes de virulência, com predomínio dos associados à adesão e colonização, incluindo os genes de virulência *yagY/ecpB, yagZ/ecpA, yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC* e *ykgK/ecpR*, que favorecem a fixação bacteriana e a formação de biofilme (Paczosa & Mecsas, 2016; Sumbana *et al*., 2023; Lu *et al*., 2025). Foram ainda detetados genes de aquisição de ferro, com *entB* e *fepC* presentes nos três isolados e *entA* em dois, e o gene de evasão imunitária *ompA* em todos os isolados (100%).

Este perfil está em consonância com estudos realizados em Moçambique e noutros países. No HCM, Sumbana *et al*., (2023) observaram elevadas prevalências de *bla*CTX-M-15 (75%), *bla*SHV (78%) e *bla*TEM (67%) em *K. pneumoniae*, além de genes como *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *qnrB1*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)* e *tet(D)*, demonstrando um perfil molecular semelhante. Massinga *et al*., (2021), em Manhiça, reportaram *bla*CTX-M-15 como variante predominante, com *bla*SHV em 42,8% e *bla*TEM em 57,1% dos isolados pós-morte. Na África do Sul, Vasaikar *et al*., (2017) encontraram *bla*SHV em 77,1%, *bla*TEM em 66,9% e *bla*CTX-M em 56,7% dos isolados de *Klebsiella* spp. Relativamente aos genes de virulência, Lu *et al*., (2025), na Arménia, verificaram que *yagZ/ecpA* estava presente em 89,3% dos isolados de *K. pneumoniae*, enquanto Sumbana *et al*., (2023), em

Moçambique, demonstraram elevada frequência de genes de adesão e biofilme, incluindo fímbrias dos tipos 1 e 3 (*mrkABCDF*). Du *et al*., (2021), na China, verificaram *entB* em 83,3% e genes de yersiniabactina (*ybtS*) em 91,7% dos isolados, e Lu *et al*., (2025) observaram que 26,8% dos isolados de *K. pneumoniae* ST37 possuíam o locus completo de yersiniabactina, incluindo *irp2*. A presença de *ompA* em 100% dos isolados está de acordo com estudos anteriores (Massinga *et al*., 2021; Sumbana *et al*., 2023).

A detecção dos clones ST231 e ST37 no presente estudo possui relevância epidemiológica, pois estes têm sido associados à disseminação global de resistência (Naha *et al*., 2021; Lu *et al*., 2025). Naha *et al*. (2021), na Índia, identificaram *K. pneumoniae* ST231 entre isolados produtores de carbapenemases, incluindo combinações com *bla*NDM-5, e Lu *et al*., (2025), na Arménia, caracterizaram um isolado *K. pneumoniae* ST37 contendo *bla*CTX-M-15, *bla*TEM-1D e *bla*SHV-11. Em conjunto, estes resultados sugerem que a presença de genes de resistência e virulência nos isolados do presente estudo poderá aumentar a capacidade de persistência bacteriana e favorecer o desenvolvimento de infecções invasivas, especialmente quando associados a múltiplos determinantes, reforçando a necessidade de contínua vigilância molecular (Massinga *et al*., 2021; D'Onofrio *et al*., 2023; Sumbana *et al*., 2021).

Os isolados de *Enterobacter* spp., compreendendo dois isolados de *E. hormaechei* (ST2692 e ST270) e um isolado de *E. kobei* (ST125/ST1990/ST2543), apresentaram genes associados à resistência aos β-lactâmicos e carbapenémicos, incluindo *bla*TEM-1B, *bla*TEM-181, *bla*CTX-M-15, *bla*OXA-1 e *bla*NDM-1. Adicionalmente, foram identificados genes de resistência aos aminoglicosídeos, incluindo *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* e *aac(6')-Ib-cr*. Entre os genes associados à resistência às quinolonas foram identificados *qnrB1*, *qnrS1*, *oqxA* e *oqxB*. Os genes *sul2* e *tet(A)*, associados à resistência às sulfonamidas e tetraciclinas, respetivamente, também foram detetados nestes isolados.

A coexistência de ESBL (*bla*CTX-M-15 e *bla*TEM) e carbapenemases (*bla*NDM-1), juntamente com genes de resistência a aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas, revela um perfil de resistência a múltiplos fármacos que limita consideravelmente as opções de tratamento para infecções por *Enterobacter* spp. Por outro lado, a presença simultânea destes elementos genéticos sugere a agregação de diversos determinantes de resistência, frequentemente transportados por elementos

genéticos móveis, o que potencia a sua disseminação entre diferentes clones bacterianos (Oni *et al*., 2025).

Em Moçambique, Sumbana, (2019), analisou por sequenciação genómica quatro isolados de *Enterobacter* spp. provenientes do HCM, e todos foram produtores de ESBL. O autor identificou os ST84 e ST125, além de novos STs, verificando a presença de *bla*CTX-M-15 em todos os isolados, associado a outras β-lactamases. Foram ainda detetados genes de resistência aos aminoglicosídeos, incluindo *aac(6')-Ib-cr*, *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*, bem como *qnrB1*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)* e *tet(D)*, demonstrando um perfil de resistência muito semelhante ao observado no presente estudo. A identificação do ST125 em ambos os estudos reforça a persistência deste clone em isolados clínicos do Hospital Central de Maputo ao longo do tempo.

Resultados semelhantes foram descritos por Oni *et al*., (2025), na Nigéria, que analisaram 98 isolados de *Enterobacter* spp. dos quais 61 eram *E. hormaechei* e 26 *E. cloacae*. Nos isolados de *E. hormaechei*, foram identificados *bla*CTX-M-15 em 33/61 (54,1%), *bla*NDM-1 em 5/61 (8,2%), *aac(6')-Ib-cr* em 38/61 (62,3%), *aph(3'')-Ib* em 40/61 (65,6%), *aph(6)-Id* em 38/61 (62,3%), *qnrB1* em 32/61 (52,5%), *qnrS1* em 13/61 (21,3%), *sul2* em 38/61 (62,3%) e *tet(A)* em 38/61 (62,3%). Entre os isolados de *E. cloacae*, *bla*CTX-M-15 foi identificado em 18/26 (69,2%), *bla*TEM-1 em 19/26 (73,1%), *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id* em 20/26 (76,9%), *aac(6')-Ib-cr* em 18/26 (69,2%), *qnrB1* em 8/26 (30,8%), *qnrS1* em 5/26 (19,2%), *sul2* em 20/26 (76,9%) e *tet(A)* em 18/26 (69,2%) (Oni *et al*., 2025).

Relativamente à tipagem molecular, os ST2692 e ST270 identificados em *E. hormaechei* e os ST125/ST1990/ST2543 observados em *E. kobei* diferem dos STs descritos por Oni *et al*., (2025), que identificaram maior diversidade clonal, incluindo ST148, ST1445, ST114, ST182, ST1053, ST850, ST1525, ST1718 e novos STs (ST1995–ST1998). Apesar destas diferenças, ambos os estudos evidenciam elevada diversidade de tipos de sequência (STs) entre isolados de *Enterobacter* spp., com a identificação de múltiplas linhagens geneticamente distintas, sugerindo que a disseminação da resistência nesta espécie ocorre através da circulação de múltiplas linhagens e pela disseminação horizontal de determinantes genéticos de resistência, em detrimento da propagação de um único clone epidémico (Oni *et al*., 2025).

Os isolados de *A. baumannii* ST1961 e ST944 apresentaram genes associados a β-lactâmicos e carbapenémicos *bla*OXA-90 e *bla*NDM-1. Adicionalmente, foram identificados determinantes de resistência aos aminoglicosídeos, incluindo *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*, bem como os genes *sul1* e *sul2*.

A identificação de *bla*OXA-90 juntamente com *bla*NDM-1 em isolados de *A. baumannii* constitui um achado de elevada importância clínica, uma vez que a combinação de oxacilinases e metalo-β-lactamases está associada a fenótipos de resistência aos carbapenémicos e reduz as alternativas terapêuticas disponíveis (Wareth *et al*., 2020; Elbadawi *et al*., 2021).

Em Moçambique, Sumbana, (2019), numa análise genómica de *A. baumannii*, caracterizou seis isolados por sequenciamento de genoma completo, identificando diferentes sequence types, nomeadamente ST758 (n=2), ST405 (n=2), ST642 (n=1) e um novo ST (n=1). Entre os determinantes de resistência identificados foram descritos genes associados a carbapenémicos, incluindo *bla*OXA (variantes OXA-23, OXA-25, OXA-58, OXA-65, OXA-68, OXA-69 e OXA-366), *bla*VIM, *bla*CARB-16 e *bla*NDM, para além de determinantes genéticos de resistência a aminoglicosídeos, incluindo *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*, e genes de resistência às sulfonamidas (*sul1* e *sul2*) e tetraciclinas (*tet(A), tet(B) e tet(39)*). A identificação destes determinantes no contexto moçambicano reforça a circulação de *A. baumannii* portador de múltiplos mecanismos de resistência.

Estudos realizados em África demonstram a ampla disseminação destes determinantes. Na Etiópia, Tufa *et al*., (2022) identificaram *bla*NDM-1 em isolados de *A. baumannii*, incluindo linhagens que apresentavam adicionalmente genes da família *bla*OXA.

No Sudão, Elbadawi *et al*., (2021), identificaram genes *bla*NDM em 17/36 (47,2%) dos isolados de *A. baumannii* analisados, demonstrando a elevada frequência deste mecanismo de resistência entre isolados clínicos. Além disso, os autores detectaram genes associados a β-lactamases de espectro estendido nesta espécie, incluindo genes da família *bla*CTX-M em 20/36 (55,6%), *bla*SHV em 24/36 (66,7%) e *bla*TEM em 18/36 (50%), evidenciando a acumulação de diferentes determinantes de resistência em *A. baumannii*.

Wareth *et al*. (2020), numa revisão sistemática sobre a distribuição temporal e espacial de *A. baumannii* resistente, na Alemanha, destacaram que genes semelhantes a *bla*OXA-23, *bla*OXA-51 e *bla*NDM representam os principais mecanismos associados à

resistência aos carbapenémicos nesta espécie. Adicionalmente demonstraram a diversidade clonal desta espécie, com identificação de diferentes linhagens associadas à disseminação hospitalar. Entre os tipos de sequência reportados nos estudos incluídos, foram descritos ST22 e ST53 em um surto envolvendo 13 isolados, ST195 e ST218 em um surto envolvendo dez pacientes, além de ST944/ST78 e ST348/ST2 em isolados provenientes de pacientes hospitalizados.

Embora os estudos comparativos apresentem diferentes perfis clonais, a identificação de STs relacionados com resistência demonstra a elevada diversidade genética desta espécie. Assim, a detecção dos ST1961 e ST944 no presente estudo acrescenta informação relevante sobre a diversidade molecular de *A. baumannii* circulante em unidades hospitalares de Moçambique, especialmente considerando a presença simultânea de determinantes associados à resistência aos carbapenémicos e aminoglicosídeos (Wareth *et al*., 2020; Sumbana, 2019; Elbadawi *et al*., 2021).

No isolado de *P. aeruginosa* ST357 foram identificados genes que conferem resistência a antibióticos β-lactâmicos e carbapenémicos, incluindo *bla*OXA-50 e *bla*NDM-1. Adicionalmente, foram detectados genes associados à resistência às tetraciclinas (*tet(A)* e *tet(G)*) e aos aminoglicosídeos, incluindo *aph(3')-IIb*. Entre os genes que conferem resistência às quinolonas foi identificado *qnrVC1*, enquanto *sul1* foi detetado como determinante associado à resistência às sulfonamidas.

A coexistência, numa mesma estirpe, de genes de resistência pertencentes a diversas classes de antimicrobianos evidencia um perfil de resistência multidroga, uma característica frequentemente observada em clones hospitalares de *P. aeruginosa* associados à disseminação global de resistência (Del Barrio-Tofiño *et al*., 2020). A associação entre carbapenemases e outros mecanismos de resistência, incluindo genes de resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamidas, pode reduzir as alternativas de tratamento para infecções severas provocadas por este microrganismo (Del Barrio-Tofiño *et al*., 2020).

Em Moçambique, Sumbana, (2019) caracterizou 19 estirpes de *P. aeruginosa* isoladas no HCM, dos quais 9 foram analisados por PCR e 10 por WGS. Entre os 10 isolados sequenciados foram identificados cinco STs: ST316 (n=3), ST1047 (n=1), ST1756 (n=1), ST274 (n=1) e ST612 (n=1). Embora estes STs sejam diferentes do ST357 identificado

no presente estudo, os resultados demonstram diversidade clonal entre isolados hospitalares de *P. aeruginosa* em Moçambique, e a necessidade de contínua vigilância.

No mesmo estudo, Sumbana, (2019) verificou que 89% (17/19) dos isolados eram produtores de carbapenemases. Entre estes, genes de β-lactamases foram identificados em 74% (13/17), incluindo *bla*OXA-10, *bla*OXA-395, *bla*OXA-396, *bla*OXA-486, *bla*OXA-488, *bla*VIM-11, *bla*TEM e *bla*SHV. Além disso, quase todos os isolados apresentaram o gene *aph(3')-IIb*, frequentemente associado a outros determinantes de resistência aos aminoglicosídeos, incluindo *aph(3'')-Ib* e *rmtB*. Foram igualmente detectados determinantes genéticos de resistência às sulfonamidas (*sul1 e sul2*) e tetraciclinas (*tet(G)* e *tet(39)*), resultados semelhantes aos mecanismos observados no presente estudo.

A presença simultânea de *bla*NDM-1 e *bla*OXA-50 no isolado de *P. aeruginosa* ST357 constitui um achado relevante, uma vez que as carbapenemases representam um dos principais mecanismos responsáveis pela resistência aos carbapenémicos nesta espécie, reduzindo as opções terapêuticas disponíveis para infecções graves causadas por este patógeno (Del Barrio-Tofiño *et al*., 2020; Elbadawi *et al*., 2021).

Dados concordantes foram descritos por Elbadawi *et al*., (2021), no Sudão, onde, entre 45 isolados de *Pseudomonas spp.*, o gene *bla*NDM foi identificado em 14 isolados (13,1% do total de bactérias Gram-negativas analisadas), enquanto genes ESBL como *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*TEM foram detetados em 28 (22,3%), 18 (21,5%) e 16 (20%) isolados, respetivamente. Estes dados demonstram a circulação de determinantes de resistência β-lactâmica em *Pseudomonas spp.* em diferentes contextos hospitalares africanos.

A identificação do isolado de *P. aeruginosa* ST357 no presente estudo é epidemiologicamente relevante, uma vez que este ST é reconhecido como uma linhagem de elevado risco de *P. aeruginosa*, associado internacionalmente a perfis MDR/XDR e à aquisição de genes de resistência, incluindo carbapenemases (Del Barrio-Tofiño *et al*., 2020). Desta forma, a detecção deste clone em conjunto com múltiplos determinantes de resistência sugere a circulação de linhagens com potencial de persistência e disseminação em ambientes hospitalares.

A análise de elementos genéticos móveis revelou a presença de plasmídeos nos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*. No isolado de *E. coli* ST167 foram identificados os

plasmídeos IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncI e IncN3. Nos isolados de *K. pneumoniae*, o isolado ST231 (clone de alto risco) apresentou os plasmídeos Col(pHAD28), IncFIB(K), IncFII(K) e IncR, enquanto os dois isolados ST37 apresentaram Col(pHAD28), IncFII(K), IncFIA(pBK30683), IncFIB(K)(pCAV1099-114), IncFIB(pNDM-Mar), IncHI1B(pNDM-MAR), RepB e repFIB. Estes plasmídeos têm sido associados à disseminação dos mecanismos de resistência encontrados, nomeadamente *bla*NDM, *bla*CTX-M e determinantes de resistência a aminoglicosídeos e quinolonas, facilitando a propagação de linhagens multirresistentes entre diferentes espécies e em ambiente hospitalar (Linkevicius *et al*., 2023; Lu *et al*., 2025). Adicionalmente, a presença de plasmídeos IncF e IncN em *E. coli* e *K. pneumoniae* tem sido amplamente documentada como veículo de disseminação de carbapenemases, contribuindo para a emergência e persistência de clones de alto risco em unidades hospitalares (Naha *et al*., 2021; Linkevicius *et al*., 2023).

A detecção de *bla*NDM-5 em *K. pneumoniae* ST37, um clone emergente, e em *E. coli* ST167, um clone internacional de alto risco, sugere a disseminação deste mecanismo de resistência no Hospital Central de Maputo, onde anteriormente havia sido descrito apenas em *E. coli* (Sumbana *et al*., 2021). Esta disseminação do *bla*NDM-5 para *K. pneumoniae* evidencia a crescente pressão selectiva e a necessidade de uma vigilância molecular contínua e integrada para monitorizar a emergência e propagação de determinantes críticos de resistência no contexto hospitalar moçambicano.

12.6. Relação entre os desfechos clínicos dos pacientes com o perfil fenotípico e molecular

No presente estudo foi observada uma frequência elevada de mortalidade de 56,3% (9/16) de pacientes diagnosticados com sépsis na UCIP, tendo sido analisados apenas os seis casos de óbito submetidos a sequenciação genómica completa. Todos os isolados de BGN revelaram um perfil de multirresistência (MDR) e com factores de virulência, sugerindo que a combinação entre os determinantes de resistência e patogénicos pode contribuir para a evolução desfavorável de parte significativa dos casos (Massinga *et al*., 2021; D'Onofrio *et al*., 2023; Scrascia *et al*., 2026). Um total de 7/16 (43,7%) pacientes apresentaram a melhoria clínica. Todavia, os dados de possível reinternamento ou complicações destes pacientes não se encontra disponível.

Embora o reduzido número de isolados não permita estabelecer uma relação estatística entre estes determinantes e o desfecho clínico, os resultados evidenciam uma tendência para maior gravidade em infecções causadas por estirpes com elevado conteúdo genético de resistência e virulência (Massinga *et al*., 2021; D'Onofrio *et al*., 2023).

A elevada mortalidade observada é mais elevada do que a referida em investigações conduzidas em Moçambique. Massinga *et al*., (2021), avaliando crianças com bacteriemia por *Klebsiella* spp. no Hospital Distrital de Manhiça, reportaram uma taxa de letalidade hospitalar de 30,7% (23/75), verificando que a mortalidade foi mais frequente em crianças infectadas por isolados multirresistentes e portadores de genes de virulência, incluindo *rmpA, traT* e *wzi-K1*. Adicionalmente, os autores observaram igualmente que os óbitos ocorreram nas primeiras 48 horas de internamento e que os isolados provenientes destes pacientes apresentavam resistência a diversas classes de agentes antimicrobianos, sugerindo que a elevada carga de resistência e virulência pode comprometer a eficácia terapêutica e favorecer rápida progressão clínica (Massinga *et al*., 2021).

Em outros contextos hospitalares, Lambregts *et al*., (2020), nos Países Baixos, avaliaram 893 episódios de bacteriemia e observaram mortalidade aos 14 dias de aproximadamente 10%, enquanto a mortalidade aos 30 dias foi de 14,9%. Embora não tenham identificado associação estatisticamente significativa entre terapêutica empírica inadequada e mortalidade após ajuste multivariado, os autores destacaram a importância da adequação precoce do tratamento antimicrobiano, particularmente em subgrupos de maior gravidade clínica.

No presente estudo, os seis casos de óbito corresponderam a infecções causadas por bactérias portadoras de múltiplos determinantes genéticos de resistência. A análise integrada dos perfis de resistência, virulência e elementos móveis (plasmídeos) revelou uma possível relação preocupante entre a carga genética de resistência, a capacidade de evasão imunitária e o insucesso terapêutico, particularmente nos casos que evoluíram para óbito. Apesar do desfecho clínico não depender exclusivamente do resistoma bacteriano, podendo também ser influenciado por factores relacionados com o hospedeiro, gravidade da doença, momento de início da antibioterapia adequada e resposta imunológica (Singer *et al*., 2016; Weiss *et al*., 2020).

O paciente infectado por *E. coli* ST167 (0561 FN), recebeu um esquema combinado com piperacilina/tazobactam, imipenem, ciprofloxacina e fluconazol. Apesar da administração de um carbapenémico (imipenem), o isolado apresentava o gene *bla*NDM-5, que confere resistência a todos os carbapenémicos, incluindo o imipenem (Chakraborty *et al*., 2021). Adicionalmente, os genes *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* comprometem a actividade da ciprofloxacina (Abubakar *et al*., 2024), enquanto a presença de ESBL (*bla*CTX-M-15) e carbapenemase inviabiliza a piperacilina/tazobactam (Horiyama *et al*., 2015; Nicasio *et al*., 2016). Assim, nenhum dos antibióticos administrados apresentava actividade contra o isolado. Para além da multirresistência, a presença de 18 genes de virulência, incluindo 5 relacionados com invasão e evasão do sistema imunitário, e de múltiplos plasmídeos (IncFIA, IncFIB, IncFII, IncI, IncN3) pode contribuir para a disseminação dos genes de resistências e gravidade da infecção (Abdullah *et al*., 2023). A combinação de resistência total aos antimicrobianos administrados, elevada virulência e capacidade de disseminação plasmidial pode justificar o óbito.

Situação semelhante foi observada no doente infectado por *K. pneumoniae* ST231, tratado empiricamente com ceftriaxona. O isolado apresentava *bla*CTX-M-15 (ESBL) e *bla*NDM-5, ambos conferindo resistência às cefalosporinas de terceira geração (Bush & Bradford, 2020), tornando a monoterapia com ceftriaxona completamente ineficaz. Adicionalmente, o isolado apresentava 9 genes de virulência, incluindo o tipo capsular K30 associado a estirpes hipervirulentas (Byarugaba *et al*., 2023), e plasmídeos IncFIB(K) e IncFII(K) que albergam genes de resistência, frequentemente responsáveis pela disseminação de carbapenemases como *bla*NDM-5 (Chen *et al*., 2021; Ma *et al*., 2024). A combinação de resistência à ceftriaxona, virulência moderada e plasmídeos disseminadores pode ter contribuido para o desfecho fatal.

No caso de *K. pneumoniae* ST37 (8839 NC), o paciente recebeu piperacilina/tazobactam e ciprofloxacina, mas o isolado apresentava plasmídeos IncFIB(pNDM-Mar) e IncHI1B(pNDM-MAR), associados à disseminação de *bla*NDM, que confere resistência a todos os β-lactâmicos, incluindo piperacilina/tazobactam (Chen *et al*., 2021; Ma *et al*., 2024), enquanto a presença de genes de resistência a fluoroquinolonas pode comprometer a actividade da ciprofloxacina (Dhara *et al*., 2024). O clone ST37 tem sido identificado como um clone de alto risco e multirresistente (MDR) em diversos contextos clínicos, frequentemente associado a plasmídeos IncF e IncHI1B que carregam múltiplos genes de

resistência (Lu *et al*., 2025). Com 10 genes de virulência, incluindo 3 relacionados com aquisição de ferro, e uma carga genética de 27 genes de resistência, a presença de múltiplos plasmídeos IncF e IncHI1B, aliada à virulência e à extensa multirresistência, pode ter determinado a falha terapêutica e o óbito.

O padrão de multirresistência semelhante foi observado em *E. hormaechei* ST2692 (7548 JME), cujo doente recebeu ceftriaxona e ampicilina. O isolado apresentava *bla*CTX-M-15, *bla*NDM-1, *bla*OXA-1 e *bla*TEM-181, que conferem resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas, incluindo ampicilina e ceftriaxona (Bush & Bradford, 2020). Estudos genómicos em *E. hormaechei* têm documentado perfis semelhantes, com a combinação de *bla*NDM-1, *bla*CTX-M-15, *bla*OXA-1 e genes de resistência a aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, resultando em fenótipos de resistência extensa (Ferreira *et al*., 2024). Embora a virulência não tenha sido caracterizada para este isolado, a presença dos genes da bomba de efluxo *oqxA* e *oqxB* potencia a resistência a múltiplas classes, e a presença de plasmídeos não especificados facilita a disseminação dos genes de resistência (Long *et al*., 2021). A combinação terapêutica instituída era completamente inativa contra o isolado, o que pode ter contribuido para o óbito.

O isolado de *E. kobei* (8724 EC), associado a um doente tratado com ceftriaxona, aciclovir e artesunato, apresentava 28 genes de resistência, com um perfil de multirresistência extenso que provavelmente incluía ESBLs e carbapenemases, tornando a ceftriaxona ineficaz (Bush & Bradford, 2020). A elevada carga de genes de resistência sugere a presença de plasmídeos disseminadores, que contribuem para o fenótipo de multirresistência e que pode justificar o óbito (Chen *et al*., 2021; Ma *et al*., 2024).

Por fim, no caso de *P. aeruginosa* ST357 (0633 LD), o doente recebeu piperacilina/tazobactam e ciprofloxacina, mas o isolado apresentava *bla*NDM e *qnrVC1*, que conferem resistência a β-lactâmicos e fluoroquinolonas, respetivamente (Kiyaga *et al*., 2022). Estudos genómicos identificaram o clone ST357 como um clone de alto risco globalmente distribuído, frequentemente associado a carbapenemases como NDM-1 e a genes de resistência a fluoroquinolonas como *qnrVC1* (Kiyaga *et al*., 2022). A presença de 22 genes de resistência, associada à resistência intrínseca de *P. aeruginosa* (baixa permeabilidade da membrana externa, bombas de efluxo) e à capacidade de formar biofilmes, torna praticamente inexistentes as opções terapêuticas (Zhao *et al*., 2024; Gupta *et al*., 2024). Embora a virulência não tenha sido caracterizada, a espécie *P.*

aeruginosa é intrinsecamente virulenta, com fatores como exotoxina A, elastase e pigmentos que contribuem para a patogenicidade (Nováková *et al*., 2023). A combinação de resistência total aos antibióticos administrados e virulência intrínseca pode justificar o desfecho clínico desfavorável observado.

13. Limitações do estudo

O estudo apresentou as seguintes limitações:

- Tamanho amostral reduzido (n=16), o que comprometeu a generalização dos resultados e a realização de análises estatísticas robustas entre perfis moleculares e desfechos clínicos.
- Reduzido número de amostras de BGN sequenciados (*Whole Genome Sequencing* - WGS).
- Défice de plataformas de bioinformática para a análise molecular de determinantes de virulência para algumas espécies de BGN.

14. Conclusão

Em síntese, com os achados deste estudo conclui-se que:

- *Klebsiella* spp. constituiu o género de bactérias Gram-negativa mais frequentemente isolada em hemoculturas de pacientes internados na UCIP-HCM, seguida por *Enterobacter* spp., *A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Cronobacter* spp.
- Os isolados de BGN caracterizados por WGS incluíram linhagens de alto risco epidemiológico, nomeadamente *E. coli* ST167, *K. pneumoniae* ST231 e *P. aeruginosa* ST357, e foram classificados como multidroga-resistentes. Foram identificados múltiplos determinantes de resistência, incluindo *bla*CTX-M-15, *bla*NDM-5, *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*OXA, além de outros determinantes associados à resistência a diferentes classes de antimicrobianos.
- Elevada frequência de mortalidade (56,3%) em pacientes com estirpes de BGN patogenica e multidroga-resistentes.

15. Recomendações

- Aumento do tamanho amostral para melhor compreensão da epidemiologia da etiologia de infecções invasivas causadas por bactérias Gram-negativas em contexto pediátrico.
- Reforçar a vigilância de infecções invasivas causadas por BGN na UCIP-HCM, incluindo a abordagem de WGS.
- Realçar o *follow-up* dos pacientes após a melhoria clínica para a compreensão dos resultados.
- Reforçar a capacidade de diagnóstico molecular da resistência aos carbapenémicos em Moçambique, incluindo a detecção e caracterização dos principais determinantes genéticos de resistência.

16. Referências bibliográficas

1. Abdullah, S., Almusallam, A., Li, M., Mahmood, M. S., Mushtaq, M. A., Eltai, N. O., Toleman, M. A., & Mohsin, M. (2023). Whole-genome-based genetic insights into blaNDM-producing clinical isolates of *E. coli* in hospital settings of Pakistan. Microbiology Spectrum, 11(5), e00584-23. https://doi.org/10.1128/spectrum.00584-23
2. Abubakar, J., Sabitu, M. Z., Muhammad, K. D., Jimoh, A. K., Egbe, O. E., Saminu, Y., Abdusalam, A., & Mohammed, Y. (2024). Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance among Enterobacterales in Africa: A systematic review. West African Journal of Medicine, 41(3), 301–310. PMID: 38788127
3. Annavajhala, M. K., Gomez-Simmonds, A., & Uhlemann, A. C. (2019). Multidrug-resistant Enterobacter cloacae complex emerging as a global, diversifying threat. *Frontiers in Microbiology, 10*, 44. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00044
4. Antochevis, L. C. (2017). *Avaliação do perfil de sensibilidade e caracterização molecular de isolados de Klebsiella pneumoniae produtores de KPC isolados de corrente sanguínea em quatro hospitais de Porto Alegre* [Dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
5. Bae, I. K., Suh, B., Ryu, R. A., Kim, H. J., Kim, S. J., Jeong, S. H., & Lee, K. (2014). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Korea producing β-lactamases with extended-spectrum activity. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 79*(3), 373–377. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.009
6. Bălăşoiu, M., Bălăşoiu, A. T., Mănescu, R., Avramescu, C., & Ionete, O. (2014). Pseudomonas aeruginosa resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods. *Current Health Sciences Journal, 40*(2), 85–89.
7. Barbosa, T. A. (2020). *Caracterização molecular de bacilos Gram-negativos isolados em unidade de terapia intensiva neonatal e detecção fenotípica e molecular de ESBL e carbapenemases* [Tese de doutorado]. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.
8. Bauwens, J. E., Spach, D. H., Schacker, T. W., Mustafa, M. M., & Bowden, R. A. (1992). Bordetella bronchiseptica pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Microbiology, 30*(9), 2474–2475. https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2474-2475.1992

9. Berkley, J. A., Lowe, B. S., Mwangi, I., Williams, T., Bauni, E., Mwarumba, S., Ngetich, R., English, M., Newton, C. R. J. C., & Maitland, K. (2005). Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *New England Journal of Medicine*, *352*(1), 39–47. https://doi.org/10.1056/NEJMoa040275
10. Besser, J., H. A. Carleton, P. Gerner-Smidt, R. L. Lindsey e E. Trees (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. Clinical Microbiology and Infection. 24(4):335-341. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013.
11. Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(8), 2145–2155. https://doi.org/10.1093/jac/dkx146
12. Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P. F., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, *300*(8), 534–543. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005
13. Borba, C. M. A., Oliveira, V. M., & Arend, L. N. V. S. (2012). Validação do teste de inibição pelo ácido aminofenilborônico para triagem de Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *48*(6), 427–433.
14. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). (2017). *Método de referência para testes de sensibilidade aos antimicrobianos*. Disponível em https://brcast.org.br.
15. Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β-lactamase-producing pathogens. Clinical Microbiology Reviews, 33(2), e 00047-19 https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19
16. Byarugaba, D. K., Erima, B., Wokorach, G., Alafi, S., Kibuuka, H., Mworozi, E., Najjuka, F., Kiyengo, J., Musinguzi, A. K., & Wabwire-Mangen, F. (2023). Genome analysis of Klebsiella pneumoniae reveals international high-risk pandemic MDR clones emerging in tertiary healthcare settings in Uganda. Pathogens, 12(11), 1334. https://doi.org/10.3390/pathogens12111334
17. Carmona, M. M. (2017). *Nanomateriales de sílice mesoestructurada: aplicación en infección y cáncer* [Tese de doutorado]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

18. Carvalhaes, C. G., Cayô, R., & Gales, A. C. (2013). Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in the intensive care unit: A real challenge to physicians, scientific community and society. *Brazilian Journal of Infectious Diseases, 17*(6), 632–633.
19. Carvalho, I., Alonso, C. A., Silva, V., Pimenta, P., Lameirão, A., Fernandes, M. R., Martins, C., & Poeta, P. (2021). Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from human septicemias: Antimicrobial resistance and virulence factors. *PLoS ONE, 16*(5), e0250525. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250525
20. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC.
21. Chakraborty, T., Sadek, M., Yao, Y., Imirzalioglu, C., Stephan, R., Poirel, L., & Nordmann, P. (2021). Cross-border emergence of *Escherichia coli* producing the carbapenemase NDM-5 in Switzerland and Germany. Journal of Clinical Microbiology, 59(3), e02238-20. https://doi.org/10.1128/JCM.02238-20
22. Chen, R., Liu, Z., Xu, P., Qi, X., Qin, S., Wang, Z., & Li, R. (2021). Deciphering the epidemiological characteristics and molecular features of blaKPC-2- or blaNDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in a newly established hospital. Frontiers in Microbiology, 12, 741093. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.741093
23. Cheong, H. S., Kim, S. Y., Wi, Y. M., Peck, K. R., Ko, K. S. (2012). Clinical significance of infections caused by extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae blood isolates with inducible AmpC β-lactamase. *Microbial Drug Resistance, 18*(5), 446–452. https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0194
24. Chun, J., A. Oren, A. Ventosa, H. Christensen, D. R. Arahal, da Costa, M. S. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 68(1):461-466. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (27th ed., CLSI supplement M100). Wayne, PA: CLSI.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (33rd ed., CLSI supplement M100). Wayne, PA: CLSI.

27. Comissão Técnica de Terapêutica e Farmácia. (2007). *Formulário Nacional de Medicamentos (FNM)* (5ª ed.). Maputo: CEGRAF SARL.
28. Conselho Municipal da Cidade de Maputo. (2013). *Mapa sanitário: Caracterização do sistema de prestação de serviços de saúde*. Pelouro de Saúde e Acção Social, Município de Maputo.
29. Cotrim, E. R., Rocha, R. D. R., & Ferreira, M. F. R. (2012). Klebsiella pneumoniae carbapenemase KPC em Enterobacteriaceae: O desafio das bactérias multirresistentes. *Pós em Revista do Centro Universitário Newton Paiva*.
30. Cunha, V. O. (2014). *Bactérias multirresistentes Klebsiella pneumoniae carbapenemase: Enzima KPC nas infecções relacionadas à assistência à saúde* [Monografia].
31. Dahdouh, E., Gómez-Gil, R., Pacho, S., Mingorance, J., Daoud, Z., & Suárez, M. (2017). Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. *PLoS ONE, 12*(4), e0176824. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176824
32. Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews, 32*(4), e00002-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19
33. Del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., & Oliver, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally acquired β-lactamases: 2020 update. *International Journal of Antimicrobial Agents, 56*(6), 106196. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106196
34. Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments, 45*, e2565. https://doi.org/10.3791/2565.
35. Dhara, L., & Tripathi, A. (2024). Contribution of genetic factors towards cefotaxime and ciprofloxacin resistance development among extended spectrum beta-lactamase producing-quinolone resistant pathogenic Enterobacteriaceae. Gene, 893, 147921. https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147921
36. Dicko, C. H., N'Dri, D. N., Snoussi, M., Nzoyikorera, N., Zouré, A. A., Kambiré, D., Elammari, I., Bouziyane, A., Halabi, M. K., Bivigou-Mboumba, B., Nayme, K., Iroungou, B. A., Khalis, M., El Kettani, A., Sylla, M., Founou, L. L., Naitlho, A., Aissaoui, O., El Bakkouri, J., Jafri, A., Kontao, F., Dickson, A.-E.-N.-M., Elmdaghri, N., Chakib, A., Bousfiha, A., Bouskraoui, M., Adnaoui, M., Dini, N., Guindo, I., &

Diawara, I. (2026). Etiology, prevalence, and mortality of sepsis among children under five years in Africa: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases, 26,* Article 1121. https://doi.org/10.1186/s12879-026-13350-2

37. Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D. J., Peto, T. E. A., & Crook, D. W. (2012). Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Genetics, 13*(9), 601–612. https://doi.org/10.1038/nrg3226
38. Dikoumba, A. C., Onanga, R., Jean-Pierre, H., Didelot, M. N., Dumont, Y., Ouedraogo, A. S., Ngoungou, E. B., & Godreuil, S. (2023). Prevalence and phenotypic and molecular characterization of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Gabon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 108*(2), 268–274. https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0168
39. Doi, Y. (2019). Treatment options for carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases, 69*(Suppl 7), S565–S575. https://doi.org/10.1093/cid/ciz830
40. D'Onofrio, V., Cartuyvels, R., Messiaen, P. E. A., Barišić, I., & Gyssens, I. C. (2023). Virulence factor genes in invasive *Escherichia coli* are associated with clinical outcomes and disease severity in patients with sepsis: A prospective observational cohort study *Microorganisms, 11*(7), 1827. https://doi.org/10.3390/microorganisms11071827
41. Dramowski, A., Bekker, A., Cotton, M. F., Whitelaw, A. C., Coffin, S. E., Reubenson, G., Finlayson, H., Coutsoudis, A., & Velaphi, S. C. (2021a). Epidemiology of clinically suspected and laboratory-confirmed bloodstream infections at a South African neonatal unit. *Journal of Infection in Developing Countries, 15*(7), 943–952. https://doi.org/10.3855/jidc.13971
42. Dramowski, A., Ong'ayo, G., Rehman, A. M., Aiken, A. M., Beylis, N. C., de Kraker, M. E. A., Chisenga, M., Cutland, C. L., Madhi, S. A., Kambugu, A., Muro, F., Reddy, E. A., Saha, S. K., Sigaúque, B., van den Bergh, R., Musicha, P., Feasey, N. A., & The MBIRA Study Collaborators. (2021b). Mortality attributable to third-generation cephalosporin resistance in Gram-negative bloodstream infections in African hospitals: A multi-site retrospective study. *JAC-Antimicrobial Resistance, 3*(1), dlab010. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab010

43. Du, F. L., Huang, Q. S., Wei, D. D., Mei, Y. F., Long, D., Liao, W. J., Wan, L. G., Liu, Y., & Zhang, W. (2021). Prevalence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring plasmid carrying blaKPC and virulence plasmid-like pLVPK. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10*, 556654. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.556654
44. Elbadawi, H. S., Elhag, K. M., Mahgoub, E., Altayb, H. N., Ntoumi, F., Elton, L., & others. (2021). The burden of virulence and antimicrobial resistance genes in phylogenetic background of non-intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections in Sudan. *BMC Microbiology, 21*, 136. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02133-1Ellington, M. J., Ekelund, O., Aarestrup, F. M., Cantón, R., Doumith, M., Giske, C. G., Grundmann, H., Hopkins, K. L., Kahlmeter, G., Koser, C. U., MacGowan, A., Mevius, D., Mulvey, M., Naas, T., Peto, T., & Woodford, N. (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: Report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(1), 2–22. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012
45. Estaleva, C. E. L., Zimba, T. F., Sekyere, J. O., Govinden, U., Chenia, H. Y., Simonsen, G. S., Haldorsen, B., Essack, S. Y., & Sundsfjord, A. (2021). High prevalence of multidrug resistant ESBL- and plasmid-mediated AmpC-producing clinical isolates of *Escherichia coli* at Maputo Central Hospital, Mozambique. *BMC Infectious Diseases, 21*, 16. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05696-y
46. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2023). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters: Version 13.0*. EUCAST. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
47. Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(2), 241–263. https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13
48. Falagas, M. E., Tansarli, G. S., Karageorgopoulos, D. E., & Vardakas, K. Z. (2014). Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerging Infectious Diseases, 20*(7), 1170–1175. https://doi.org/10.3201/eid2007.121004
49. Ferraz Junior, C. A. G., & Bonilha, H. (2009). *Protocolo de atendimento: Rotina de hemoculturas*. Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).
50. Ferreira, C. M., Naveca, F. G., Ferreira, G. M. A., Barbosa, M. N. S., de Souza, V. C., Calheiros, F. O., Souza, V. S., & Ferreira, W. A. (2024). Whole-genome analysis

of extensively drug-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from a patient with Non-HodgkinLymphoma. *Genes*, 15(6), 814. https://doi.org/10.3390/genes15060814

51. First, N. J., Parrish, K. M., Martínez-Pérez, A., González-Fernández, Á., Bharrhan, S., Woolard, M., McLachlan, J. B., Scott, R. S., Wang, J., & Gestal, M. C. (2023). *Bordetella* spp. block eosinophil recruitment to suppress the generation of early mucosal protection. *Cell Reports*, *42*(11), https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113294
52. Fleischmann-Struzek, C., Goldfarb, D. M., Schlattmann, P., Schlapbach, L. J., Reinhart, K., & Kissoon, N. (2018). The global burden of paediatric and neonatal sepsis: A systematic review. *The Lancet Respiratory Medicine*, 6(3), 223–230. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30063-8
53. Fleischmann-Struzek, C., Mellhammar, L., Rose, N., Cassini, A., Rudd, K. E., Schlattmann, P., Allegranzi, B., Reinhart, K., & Rhodes, A. (2020). Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: Results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Medicine*, *46*(8), 1552–1562. https://doi.org/10.1007/s00134-020-06151-x
54. Garcia, J. V. A. dos S., & Comarella, L. (2021). O uso indiscriminado de antibióticos e as resistências bacterianas. *Saúde e Desenvolvimento*, *10*(18), 78–87.
55. Garnacho-Montero, J., & Timsit, J. F. (2019). Managing *Acinetobacter baumannii* infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *32*(1), 69–76.
56. Garrine, M., Quintó, L., Costa, S. S., Messa, A., Jr., Massinga, A. J., Vubil, D., Nhampossa, T., Massora, S., Ácacio, S., Cossa, A., Sigaúque, B., Bassat, Q., Couto, I., & Mandomando, I. (2023). Epidemiology and clinical presentation of community-acquired Staphylococcus aureus bacteraemia in children under 5 years of age admitted to the Manhiça District Hospital, Mozambique, 2001–2019. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *42*(5), https://doi.org/10.1007/s10096-023-04580-2
57. Garza-González, E., Bocanegra-Ibarias, P., Rodríguez-Noriega, E., Morfín-Otero, R., & González-Díaz, E. (2020). Whole-genome sequencing for identification and epidemiological surveillance of bacterial pathogens in clinical microbiology. *Infection, Genetics and Evolution*, *83*,. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104305

58. Gastmeier, P., Schwab, F., Behnke, M., Geffers, C., & Leistner, R. (2012). Excess mortality and prolongation of stay due to bloodstream infections caused by multiresistant pathogens in Germany. *Deutsche Medizinische Wochenschrift, 137*, 1689–1692.
59. Ghosh, H. K., & Tranter, J. (1979). *Bordetella bronchicanis (bronchiseptica) infection in man: Review and a case report*. *Journal of Clinical Pathology, 32*, 546–548.
60. Godfrey, R., Majaliwa, E., Assenga, E. N., Peck, R., Mtei, L., Mshana, S. E., & Msuya, S. E. (2022). Aetiology, antimicrobial susceptibility and outcome of children with sepsis admitted at Muhimbili National Hospital, Dar es Salaam, Tanzania. *Pan African Medical Journal, 42*, 167.
61. Goto, S. H., Mazza, B. F., Freitas, F. G. R., & Machado, F. R. (2017). Influência do status perfusional nas saturações venosas de oxigênio central e mista em pacientes sépticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia, 67*, 607–614.
62. Gracia, R. C. R., Zarain, P. L., & Laguna, Y. M. (2006). *Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedeiro II*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
63. Gray, J. W. (2004). A 7-year study of bloodstream infections in an English children's hospital. *European Journal of Pediatrics, 163*, 530–535.
64. Grupo de Trabalho da Parceria Global da Resistência a Antibióticos (GARP). (2015). *Análise situacional e recomendações: Uso e resistência aos antibióticos em Moçambique*. Centro para o Estudo de Dinâmica de Doenças, Economia e Política (CDDEP).
65. Gubbels Bupp, M. R. (2021). Sex, the aging immune system, and immunological outcomes. *Current Opinion in Immunology*, https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.05.003
66. Gupta, C., Lee, S. S. J., Sahu, M., Wu, K. S., & Mukherjee, S. (2024). Ceftazidime-avibactam versus other antimicrobial agents for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A systematic review and meta-analysis. *Infection, 52*, 2183–2193. https://doi.org/10.1007/s15010-024-02371-1
67. Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B., & Kallen, A. J. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases, 53*(1), 60–67.

68. Haji, S. H., Aka, S. T. H., & Ali, F. A. (2021). Prevalence and characterisation of carbapenemase encoding genes in multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *PLOS ONE, 16*(11), e0259005.
69. Hoffmann, H., & Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(9), 5306–5318.
70. Holý, O., Alsonosi, A., Hochel, I., Röderová, M., Petrželová, J., Kmet, V., & Forsythe, S. (2019). Antibiotic susceptibility of Cronobacter spp. isolated from clinical samples. *Polish Journal of Microbiology*, *68*(1), 5–14. https://doi.org/10.21307/PJM-2019-001
71. Holý, O., Forsythe, S. J. (2014). *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, *86*(3), 169–177. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.01
72. Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., & Lee, K. (2015). Epidemiology and characteristics of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & Chemotherapy*, *47*(2), 81–97.
73. Horiyama, T., Kanazawa, S., Hara, T., Izawa, M., Sato, T., Yamaguchi, T., Tsuji, M., & Maki, H. (2015). Comparison of the risk of acquiring in vitro resistance to doripenem and tazobactam/piperacillin by CTX-M-15-producing Escherichia coli. Journal of Infection and Chemotherapy,21(5) https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.01.0
74. Hu, F. P., Guo, Y., Zhu, D. M., Wang, F., Jiang, X. F., & Xu, Y. C. (2016). Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005–2014. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(Suppl 1), S9–S14.
75. Hu, F., Guo, Y., Yang, Y., Zheng, Y., Wu, S., Jiang, X., Zhu, D., Wang, F., & China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET). (2019). Resistance reported from China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) in 2018. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *38*(12), https://doi.org/10.1007/s10096-019-03673-1
76. Huang, J., Xu, Q., Liu, F., Xiong, H., & Yang, J. (2021). *Enterobacter cloacae* infection of the shoulder in a 52-year-old woman without apparent predisposing risk factor: A case report and literature review. *BMC Infectious Diseases*, *21*, 31. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05689-x

77. Hufnagel, D. A., DePas, W. H., & Chapman, M. R. (2015). The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiology Spectrum, 3*(3), MB-0014-2014. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014

78. Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., & Forsythe, S. (2008). The taxonomy of the genus *Cronobacter*: Proposal of new species and reclassification of *Enterobacter sakazakii*. *BMC Evolutionary Biology, 8*, 64. https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-64

79. Izdebski, R., Baraniak, A., Herda, M., Fiett, J., Bonten, M. J. M., Carmeli, Y., Goossens, H., Hryniewicz, W., Brun-Buisson, C., & Gniadkowski, M. (2015). MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 70*(1), 48–56. https://doi.org/10.1093/jac/dku359.

80. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology, 45*(9), 2761–2764. https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07

81. Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria: A review of molecular mechanisms and global dissemination. *Frontiers in Microbiology, 12*, 731011. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.731011

82. Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 139*(3), 155–162. https://doi.org/10.1067/mlc.2002.121550

83. Joseph, S., Sonbol, H., Hariri, S., Desai, P., McClelland, M., & Forsythe, S. J. (2012). Diversity of the genus *Cronobacter* and its association with neonatal infections. *BMC Genomics, 13*, 225. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-225

84. Kenga, D. B., Gebretsadik, T., Simbine, S., Maússe, F. E., Charles, P., Zaqueu, E., Fernando, H. F., Manjate, A., Sacarlal, J., & Moon, T. D. (2021). Community-acquired bacteremia among HIV-infected and HIV-exposed uninfected children hospitalized with fever in Mozambique. International Journal of Infectious Diseases, 109, 99–107. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.047

85. Kennedy, U. K., Moulin, J., Bührer, L., Lim Fang Nian, J., Halter, L., Böhni, L., Güzelgün, M., Menon, K., Lee, J. H., Schlapbach, L. J. e Held, U. (2025). Sex Differences in Pediatric Sepsis Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Critical Care Explorations*. 7(4): https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000001226.

86. Kiyaga, S., Kyany'a, C., Muraya, A. W., Smith, H. J., Mills, E. G., Kibet, C., Mboowa, G., & Musila, L. (2022). Genetic diversity, distribution, and genomic characterization of antibiotic resistance and virulence of clinical Pseudomonas aeruginosa strains in Kenya. Frontiers in Microbiology, 13, https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.835403
87. Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *16*(10), 626–638. https://doi.org/10.1038/nri.2016.90
88. Kobayashi, T., Ikeda, M., Okada, Y., Higurashi, Y., Okugawa, S., & Moriya, K. (2021). Clinical and microbiological characteristics of recurrent *Escherichia coli* bacteremia. *Microbiology Spectrum*, *9*(2), https://doi.org/10.1128/Spectrum.01399-21
89. Koju, P., Shrestha, R., Shrestha, A., Tamrakar, S., Rai, A., Shrestha, P., Madhup, S. K., Katuwal, N., Karki, P., Tamang, P., Thekkur, P., & Shakya, S. (2022). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from chicken cecum samples and factors contributing to antimicrobial resistance in Nepal. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *7*(9), 249. https://doi.org/10.3390/tropicalmed7090249
90. Krapp, F., García, C., Hinostroza, N., Astocondor, L., Rondon, C. R., Ingelbeen, B., Alpaca-Salvador, H. A., Amaro, C., Aguado Ventura, C., Barco-Yaipén, E., Bocangel Fernandez, C., Briones, A., Burgos, A., Campana, R., Castillo, K., Castañeda-Sabogal, A., Coaquira, A., Concha-Velasco, F., Cuadros, E. C., Chincha, O., Diaz, J. C., Díaz Sipión, R., Fernandez, V., Hueda-Zavaleta, M., López, E., Valera-Krumdieck, M., Vásquez, R., Vidaurre Torres, A. M., Villegas-Chiroque, M., Sarmiento Lopez, F., Sullón Zavaleta, P. A., Sierra Chavez, E., Paricahua Peralta, E., Peralta Córdova, T., Pino-Dueñas, J. E., & Jacobs, J. (2023). Prevalence of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria bloodstream infections in Peru and associated outcomes: VIRAPERU Study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *109*(5), 1095–1106. https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0556
91. Kumar, N. R., Balraj, T. A., Cooper, K. K., & Prashant, A. (2025). Whole-genome sequencing and bioinformatic tools powered by machine learning to identify antibiotic-resistant genes and virulence factors in Escherichia coli from sepsis. *Microbial Genomics*, *11*(8), Article 001465. https://doi.org/10.1099/mgen.0.001465
92. Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*, *10*(3), 373. https://doi.org/10.3390/pathogens10030373

93. Lambregts, M. M. C., Wijnakker, R., Bernards, A. T., Visser, L. G., le Cessie, S., & de Boer, M. G. J. (2020). Mortality after delay in adequate empirical antimicrobial treatment of bloodstream infection. *Journal of Clinical Medicine, 9*(5), 1378. https://doi.org/10.3390/jcm9051378

94. Li, Y., Xu, X., Wang, S., Zhang, Y., Li, X., Chen, Y., Wang, J., & Guo, X. (2023). Genomic characterization and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from powdered infant formula and related food products in China. *Foods, 12*, 1945. https://doi.org/10.3390/foods12101945

95. Linkevicius, M., Bonnin, R. A., Alm, E., Svartström, O., Apfalter, P., Hartl, R., Struelens, M. J., & ECDC/Euro-GASP network collaborators. (2023). Rapid cross-border emergence of *Escherichia coli* producing NDM-5 in the European Union/European Economic Area, 2012 to June 2022. *Eurosurveillance, 28*(19), 2300209. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.19.2300209

96. Linz, B., Ivanov, Y. V., Preston, A., Brinkac, L., Parkhill, J., Kim, M., Harris, S. R., Goodfield, L. L., Fry, N. K., & Gorringe, A. R. (2016). Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. *BMC Genomics, 17*, 767. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3112-5

97. Lipworth, S., Vihta, K. D., Davies, T., Wright, S., Tabirao, M., Chau, K., Barker, C., Harris, S. R., & Eyre, D. W. (2022). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance phenotype of paediatric bloodstream infections caused by Gram-negative bacteria. *Communications Medicine, 2*, 101. https://doi.org/10.1038/s43856-022-00161-0

98. Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z. M., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., Robinson, E. R., & Pallen, M. J. (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: An embarrassment of choice, a world of opportunity. Nature Reviews Microbiology, 10, 599–606. https://doi.org/10.1038/nrmicro2850

99. Long, Y., Lu, X., Ni, X., Liu, J., Wang, M., Li, X., Li, Z., Zhou, H., Li, Z., Wu, K., Wang, W., Yang, L., Xu, J., Chen, H., & Kan, B. (2021). High carriage rate of multiple resistant plasmids harboring quinolone resistance genes in Enterobacter species isolated from healthy individuals. Antibiotics, 11(1), 15. https://doi.org/10.3390/antibiotics11010015

100. Lu, S., Sheng, J., Ter-Stepanyan, M. M., Wang, Y., & Mkrtchyan, H. V. (2025). Genomic characterization of an ESBL-producing Klebsiella pneumoniae ST37 recovered from a hospitalized patient in Armenia. *Microbiology Spectrum, 13*, e00332-25. https://doi.org/10.1128/spectrum.00332-25

101. Ma, L., Qu, Y., Wang, W., & Wang, D. (2024). Characterization of Klebsiella pneumoniae carrying the blaNDM-1 gene in IncX3 plasmids and the rare In1765 in an IncFIB-IncHI1B plasmid. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 13, 1324846. https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1324846

102. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection, 18*(3), 268–281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

103. Mahaluça, F. A., Essack, S. Y., & Sacarlal, J. (2018). The etiology of hospital infections in the intensive care unit of a reference hospital in Southern Mozambique. *Clinical Microbiology: Open Access, 7*, 319. https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000319

104. Mahaluça, F. (2019). Perfil da resistência antibacteriana na unidade de cuidados intensivos pediátricos e cuidados intermédios dos adultos do Hospital Central de Maputo. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27710.95041

105. Mahmood, R. A., & Hussein, M. N. (2022). Study of antibiotic resistant genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burns and wounds. *Archives of Razi Institute, 77*(1), 403–411. https://doi.org/10.22092/ARI.2021.356681.1893

106. Malekzadegan, Y., Rastegar, E., Moradi, M., Heidari, H., & Sedigh Ebrahim-Saraie, H. (2017). Antimicrobial resistance pattern and frequency of multidrug-resistant *Enterobacter* spp. at a tertiary care hospital in southwest of Iran. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University, 6*(3), 33–39.

107. Manandhar, S., Hirabayashi, A., Furukawa, T., Takahashi, H., Tateda, K., & Suzuki, M. (2022). Whole genome sequencing analysis of an *Enterobacter kobei* outbreak in a neonatal intensive care unit in Nepal. *Journal of Hospital Infection, 125*, 60–66. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.03.019

108. Mandomando, I., Sigaúque, B., Morais, L., Bassat, Q., & Alonso, P. L. (2010). Antimicrobial drug resistance trends of bacteremia isolates in a rural hospital in southern Mozambique. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 83*(1), 152–157. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0289

109. Marques, P. B. (2016). *Caracterização molecular de Klebsiella pneumoniae produtora de β-lactamases de espectro estendido e carbapenemase tipo KPC isoladas de pacientes hospitalizados em Belém do Estado do Pará* [Tese de doutoramento, Universidade Federal do Pará].

110. Massinga, A. J., Garrine, M., Messa, A. Jr., Vubil, D., Mandomando, I., & Sigaúque, B. (2021). *Klebsiella* spp. cause severe and fatal disease in Mozambican children: Antimicrobial resistance profile and molecular characterization. *BMC Infectious Diseases, 21*, 526. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06215-1

111. Mate, I., Coimbra, V., & Sigaúque, B. (2019). Knowledge, attitudes and practices regarding antibiotic use in Maputo City, Mozambique. *PLOS ONE, 14*, e0210561.

112. Moreira, V. C., & Freire, D. (2011). *Klebsiella pneumoniae e sua resistência a antibióticos*. In *VI Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás*. Goiânia, Brasil.

113. Mortazavi, S. H., Mansouri, F., Azizi, M., Alvandi, A., Karbasfrushan, A., Madadi-Goli, N., Fereshteh, S., & Ahmadi, K. (2018). Prevalence of class I and II integrons among multidrug-resistant Enterobacter cloacae isolates obtained from clinical samples of children in Kermanshah, Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research, 12*(12), DC13–DC16. https://doi.org/10.7860/JCDR/2018/37826.12396

114. Moyo, S. J., Manyahi, J., Aboud, S., Mshana, S. E., & Mshana, S. E. (2025). Extended-spectrum β-lactamase-producing Gram-negative bacteria are associated with high mortality in children with bloodstream infections in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Infectious Diseases, 25*, 1416.

115. Mujahid, F., Rasool, M. H., Shafiq, M., Aslam, B., & Khurshid, M. (2024). Emergence of carbapenem-resistant uropathogenic Escherichia coli strains (ST405 and ST167) carrying blaCTX-M-15, blaNDM-5 and multiple virulence factors in hospitalized patients. *Pathogens, 13* (11), https://doi.org/10.3390/pathogens13110964

116. Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B.

H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

117. Naha, S., Sands, K., Mukherjee, S., Saha, B., Dutta, S., & Basu, S. (2021). OXA-181-like carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* ST14, ST15, ST23, ST48 and ST231 among septicemic neonates: Co-existence with NDM-5, resistome, transmissibility and genomic diversity. *mSphere*, https://doi.org/10.1128/mSphere.01156-20

118. Nicasio, A. M., VanScoy, B. D., Mendes, R. E., Castanheira, M., Bulik, C. C., Okusanya, O. O., Bhavnani, S. M., Forrest, A., Jones, R. N., Friedrich, L. V., Steenbergen, J. N., & Ambrose, P. G. (2016). Pharmacokinetics-pharmacodynamics of piperacillin-tazobactam against extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in an in vitro infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(4), 2075–2080. https://doi.org/10.1128/AAC.02747-15

119. Nogueira, F. J. R. (2022). Caracterização de genes de virulência em bactérias gram-negativas isoladas de pacientes com pneumonia [Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Maranhão]. Repositório Institucional da Universidade Federal do Maranhão.

120. Norbury, W., Herndon, D. N., Tanksley, J., Jeschke, M. G., & Finnerty, C. C. (2016). Infection in burns. *Surgical Infections*, https://doi.org/10.1089/sur.2013.134

121. Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, *69*(Suppl 7), S521–S528. https://doi.org/10.1093/cid/ciz824

122. Nováková, K., & Kolář, M. (2023). Virulence factors of Pseudomonas aeruginosa as a therapeutic target in multidrug-resistant strains. Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství, 29(1), 11–19. PMID: 37586087

123. Oni, F. I., Afolayan, A. O., Oaikhena, A. O., Odih, E. E., Ikhimiukor, O. O., Ogunleye, V. O., Aboderin, A. O., Olabisi, O. F., Amupitan, A. A., Fadeyi, A., Raheem, R. A., Olanipekun, B. A., Elikwu, C. J., Sadare, O. A., Oshun, P. O., Oduyebo, O. O., Ojo, F., Adeyemo, A. T., Mba, I. E., Egwuenu, A., Okwor, T. J., Underwood, A., Argimon, S., Ihekweazu, C., Aanensen, D. M., & Okeke, I. N. (2025). Whole-genome sequencing reveals *Enterobacter hormaechei* as a key bloodstream pathogen in six tertiary care hospitals in southwestern Nigeria. *Microbial Genomics*, *11*(10), 001508. https://doi.org/10.1099/mgen.0.001508

124. Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80*(3), 629–661. https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15

125. Parajuli, N. P., Acharya, S. P., Mishra, S. K., Parajuli, K., Rijal, B. P., Pokhrel, B. M., & Dahal, R. K. (2017). High burden of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria causing healthcare-associated infections in a critical care unit of Nepal. *Antimicrobial Resistance & Infection Control, 6*, 67. https://doi.org/10.1186/s13756-017-0222-z

126. Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *New England Journal of Medicine, 362*(19), 1804–1813. https://doi.org/10.1056/NEJMra0904124

127. Piperaki, E. T., Tzouvelekis, L. S., Miriagou, V., & Daikos, G. L. (2019). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: In pursuit of an effective treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.016

128. Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *blaVIM-2* carbapenem-hydrolyzing β-lactamase gene and two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(2), 546–552.

129. Pons, M. J., Vubil, D., Guiral, E., Jaintilal, D., Fraile, O., Soto, S., Sigaúque, B., Nhampossa, T., Aide, P., Alonso, P., Vila, J., Mandomando, I., & Ruiz, J. (2015). Characterisation of extended-spectrum β-lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteraemia and urinary tract infection in Mozambique. *Journal of Medical Microbiology*, *64*(7), 799–807.

130. Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents, 45*(6), 568–585. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001

131. Porta, M. (Ed.). (2014). *A dictionary of epidemiology* (6th ed.). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/acref/9780199976720.001.0001

132. Punchak, M., Hall, K., Seni, A., Cedillo, M. A., Breckwoldt, J., Langer, M., & Molyneux, E. (2018). Epidemiology of disease and mortality from a pediatric intensive care unit in Mozambique. *Pediatric Critical Care Medicine, 19*(11), e603–e610. https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000001660

133. Rada, B., & Leto, T. L. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: Relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends in Microbiology, 21*(2), 73–81. https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.004

134. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2016). *Rang & Dale's pharmacology* (9th ed.). *Elsevier.*

135. Rice, L. B. (2010). Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology, 31*(Suppl 1), S7–S10. https://doi.org/10.1086/655995

136. Salipante, S. J., SenGupta, D. J., Cummings, L. A., Land, T. A., Hoogestraat, D. R., & Cookson, B. T. (2015). Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology, 53*(4), 1072–1079. https://doi.org/10.1128/JCM.03385-14

137. Santona, A., Sumbana, J. J., Fiamma, M., Deligios, M., Taviani, E., Simbine, S. E., Zimba, T., Sacarlal, J., Rubino, S., & Paglietti, B. (2022). High-risk lineages among extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal infections in Maputo Central Hospital, Mozambique. *International Journal of Antimicrobial Agents, 60*(4), https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106649

138. Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., Moriyama, K., Finck-Barbançon, V., Buchaklian, A., Lei, M., & Wiener-Kronish, J. P. (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *The EMBO Journal, 22*(12), https://doi.org/10.1093/emboj/cdg290

139. Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. Microbial Genomics, 7(11), Article 000685. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685

140. Scrascia, M., Tempesta, A. A., Cafiso, V., Pazzani, C., & Mezzatesta, M. L. (2026). Bloodstream infections due to carbapenemase-producing Escherichia coli: A comprehensive. review. *Antibiotics, 15*(2), 176 https://doi.org/10.3390/antibiotics15020176

141. Seemann, T. (2016). ABRicate: Mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. GitHub repository. https://github.com/tseemann/abricate

142. Seman, A., Mihret, A., Sebre, S., Awoke, T., Yeshitela, B., Yitayew, B., Aseffa, A., Asrat, D., & Abebe, T. (2022). Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β-lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from bloodstream infection suspected patients in Addis Ababa, Ethiopia. Addis Ababa University.

143. Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *22*(1), 90–101. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002

144. Shi, X., Wang, H., Wang, X., Jing, H., Duan, R., & Qin, S. (2021). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from cerebrospinal fluid and blood. *PLoS ONE*, *16*(5), e0251547. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251547

145. Sigaúque, B., Roca, A., Mandomando, I., Morais, L., Quintó, L., Sacarlal, J., Macete, E., Nhamposa, T., Machevo, S., Aide, P., Bassat, Q., Bardají, A., Nhalungo, D., Soriano-Gabarró, M., Flannery, B., Menendez, C., Levine, M. M., & Alonso, P. L. (2009). Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in Mozambique. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *28*(2), 108–113. https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318187a87d

146. Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, *315*(8), 801–810. https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287

147. Sinnott, J. T., Blazejowski, C., & Bazzini, M. D. (1989). *Bordetella bronchiseptica* endocarditis: A tale of a boy and his dog. *Clinical Microbiology Newsletter*, *11*(14), 111–112.

148. Souza, R. C. (2018). *Caracterização fenotípica e molecular dos mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em linhagens clínicas de Klebsiella pneumoniae isoladas do Amazonas* [Tese de doutorado]. Universidade Federal de São Carlos.

149. Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Lemons, J. A., Donovan, E. F., Stark, A. R., Tyson, J. E., Oh, W., Bauer, C.

R., Korones, S. B., Shankaran, S., Laptook, A. R., Stevenson, D. K., Papile, L. A., & Poole, W. K. (2002). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: The experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics, 110*(2), 285–291. https://doi.org/10.1542/peds.110.2.285

150. Sufiana, M. V., Langa, J. C., & Sumbana, J. J. (2020). *Caracterização fenotípica e molecular de β-lactamases de amplo espectro e carbapenemase KPC em Klebsiella pneumoniae isolada em hemoculturas no Hospital Central de Maputo* [Dissertação de licenciatura]. Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.

151. Sumbana, J. J. (2019). *Phenotypic and molecular characterization of extraintestinal pathogenic Escherichia coli and other Gram-negative invasive bacteria in Mozambique* (Doctoral dissertation, University of Sassari). UNITesi – Università degli Studi di Sassari. https://hdl.handle.net/20.500.14242/155910

152. Sumbana, J. J., Santona, A., Abdelmalek, N., Fiamma, M., Deligios, M., Manjate, A., Sacarlal, J., Rubino, S., & Paglietti, B. (2023). Polyclonal multidrug ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and emergence of susceptible hypervirulent Klebsiella pneumoniae ST23 isolates in Mozambique. *Antibiotics, 12*(9), 1439. https://doi.org/10.3390/antibiotics12091439

153. Sumbana, J. J., Santona, A., Fiamma, M., Taviani, E., Deligios, M., Zimba, T., Lucas, G., Sacarlal, J., Rubino, S., & Paglietti, B. (2021). *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli* ST405 isolate coharboring *bla*NDM-5 and *bla*CTX-M-15: A new threat in Mozambique. *Microbial Drug Resistance, 27*(12), 1633–1640. https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0334

154. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., & Magrini, N. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases, 18*(3), 318–327. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3

155. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2012). *Microbiologia* (10ª ed.). Porto Alegre: Artmed.

156. Tufa, T. B., Mackenzie, C. R., Orth, H. M., Wienemann, T., Nordmann, T., Abdissa, S., Hurissa, Z., Schönfeld, A., Bosselmann, M., Häussinger, D., Pfeffer, K.,

Luedde, T., Fuchs, A., & Feldt, T. (2022). Prevalence and characterization of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria isolated from febrile hospitalized patients in central Ethiopia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control, 11*, Article 8. https://doi.org/10.1186/s13756-022-01053-7

157. Tumbarello, M., Sanguinetti, M., Montuori, E., Trecarichi, E. M., Posteraro, B., Fiori, B., Citton, R., D'Inzeo, T., Fadda, G., Cauda, R., & Spanu, T. (2007). Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: Importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51*(6), 1987–1994. https://doi.org/10.1128/AAC.01509-06

158. Vardakas, K. Z., & Falagas, M. E. (2017). Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents, 49*(2), 233–238. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.001

159. Vasaikar, S., Obi, L., Morobe, I., & Bisi-Johnson, M. (2017). Molecular characteristics of antimicrobial resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* from clinical isolates in South Africa. *African Journal of Laboratory Medicine, 6*(2), 574. https://doi.org/10.4102/ajlm.v6i2.574

160. Verdi, C. M., Zimmermann, C. E. P., Andrade, E. N. C., Ledur, P. C., & Velasquez, P. G. (2016). Detecção laboratorial dos mecanismos de resistência da *Klebsiella pneumoniae*: Uma revisão. *Revista Saúde Integrada.*

161. Wareth, G., Brandt, C., Sprague, L. D., Neubauer, H., & Pletz, M. W. (2020). Spatio-Temporal Distribution of *Acinetobacter baumannii* in Germany—A Comprehensive Systematic Review of Studies on Resistance Development in Humans (2000–2018). Microorganisms, 8(3),375. https://doi.org/10.3390/microorganisms8030375

162. Watson, R. S., Carroll, E. D., Carter, M. J., Kissoon, N., Ranjit, S., & Schlapbach, L. J. (2024). The burden and contemporary epidemiology of sepsis in children. *The Lancet Child & Adolescent Health, 8(9),* 670–681. https://doi.org/10.1016/S2352-4642(24)00140-8

163. Wattal, C., & Goel, N. (2020). Pediatric blood cultures and antibiotic resistance: An overview. *Indian Journal of Pediatrics, 87*(2), 125–131. https://doi.org/10.1007/s12098-019-03125-5

164. Weiss, S. L., Peters, M. J., Alhazzani, W., Agus, M. S. D., Flori, H. R., Inwald, D. P., Ely, E. W., Yehya, N., & Hall, M. W. (2020). Surviving Sepsis Campaign International Guidelines for the Management of Septic Shock and Sepsis-Associated Organ Dysfunction in Children. *Intensive Care Medicine*, *46*(Suppl 1), 10–67. https://doi.org/10.1007/s00134-019-05878-6

165. Wick, R. R., Heinz, E., Holt, K. E., & Wyres, K. L. (2018). Kaptive Web: User-friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(6), https://doi.org/10.1128/JCM.00197-18

166. Willems, J., Hermans, E., Schelstraete, P., Depuydt, P., & De Cock, P. (2021). Optimizing the use of antibiotic agents in the pediatric intensive care unit: A narrative review. *Pediatric Drugs*, *23*(1), 39–53. https://doi.org/10.1007/s40272-020-00426-y

167. Woolfrey, B. F., & Moody, J. A. (1991). Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clinical Microbiology Reviews*, *4*(3), 243–255. https://doi.org/10.1128/CMR.4.3.243

168. World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748

169. World Health Organization. (2017). *WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.* https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12

170. World Health Organization. (2024a). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2024.* https://www.who.int/publications/

171. World Health Organization. (2024b). *Global report on infection prevention and control.* https://www.who.int/publications/i/item/9789240051164

172. World Health Organization. (2020a). *Global report on the epidemiology and burden of sepsis: Current evidence, prevention and management strategies.* https://www.who.int/publications/i/item/9789240010789

173. World Health Organization. (2020b). *Glossary of health emergency and disaster risk management.* https://iris.who.int/handle/10665/331716

174. World Health Organization. (2024c). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance.* https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461

175. Xia, C., Yan, R., Liu, C., Zhai, J., Zheng, J., Chen, W., & Cao, X. (2024). Epidemiological and genomic characteristics of global *bla*NDM-carrying *Escherichia coli*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 23, 58. https://doi.org/10.1186/s12941-024-00719-x

176. Yang, Y., Yang, Y., Chen, G., Lin, M., Chen, Y., He, R., Galvão, N. K., Mohamed, A. E. A., Roberts, A. P., Wu, Y., Zhong, L., Liang, X., Qin, M., Ding, X., Deng, W., Huang, S., Li, H., Dai, M., Chen, D., Zhang, L., Liao, K., Xia, Y., & Tian, G. (2021). Molecular characterization of carbapenem-resistant and virulent plasmids in *Klebsiella pneumoniae* from patients with bloodstream infections in China. *Emerging Microbes & Infections, 10*(1) https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1902240

177. Zavascki, A. P., Bulitt, J. B., & Landersdorfer, C. B. (2013). Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy, 11*(12), 1333–1353. https://doi.org/10.1586/eri.13.106

178. Zhao, Y., Xu, H., Wang, H., Zhang, Y., Li, X., Chen, J., Liu, W., Sun, Q., Huang, Y., Zhou, D., Zhang, X., Wang, L., Liu, Y., Feng, J., & Yang, M. (2024). Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Genetic control mechanisms and therapeutic advances. *Molecular Biomedicine, 5*, 62. https://doi.org/10.1186/s43556-024-00221y

17. ANEXOS

Anexo 1. Carta de cobertura da Faculdade de Medicina-UEM

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

Faculdade de Medicina

Exmo. Senhores
CIBS FM&HCM

Assunto: Carta de Cobertura ao Protocolo de Investigação da **Lic. Marilia Mussagy**

A **Lic. Marília Mussagy**, estudante do curso de Mestrado em Biociência na Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, está a elaborar uma dissertação com o título ***"Perfil fenotípico e molecular de bactérias gram negativas isolados em hemoculturas e desfechos clínicos dos pacientes na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do HCM entre Janeiro a Dezembro de 2023".*** Ciente da relevância desta pesquisa, o Departamento de Microbiologia da FAMED acolhe e sugere a implementação do estudo que terá o apoio do próprio Departamento.

Sem mais de momento, endereçamos cordiais saudações

Maputo, 20 Março de 2024

O Director

Professor Doutor Jahit Sacarlal, MD, MPH, PhD

(Professor Catedrático)

CC: Chefe do Departamento de Microbiologia da FAMED/UEM

Anexo 2. Carta de aprovação ética do projecto pelo Comité Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medina/Hospital Central de Maputo.

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

Comité Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medicina/Hospital Central de Maputo

HCM

(CIBS FM&HCM)

Dra. Arlete Artur Neta Mariano, Vice-Presidente do Comité Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medicina/Hospital Central de Maputo (CIBS FM&HCM)

CERTIFICA

Que este Comité avaliou a proposta do (s) Investigador (es) Principal (is):
Nome (s): ***Marília Violeta Sufiana Mussagy***
Protocolo de investigação: ***Sem versão, de Maio de 2024***
Consetimento Informado: ***Sem versão, sem data***
Instrumento de recolha de dados: ***Sem versão, sem data***

Do estudo:
*TITULO:"****Perfil fenotípico e molecular de bactérias Gram-negativas isoladas em hemoculturas e desfechos clínicos dos pacientes internados na unidade de cuidados intensivos pediátricos do Hospital Central de Maputo entre Janeiro a Dezembro de 2023."***

1º O CIBSFM&HCM ***APROVA*** *o pedido da* ***PRIMEIRA RENOÇÃO*** *do protocolo com* ***Sem versão, de Maio de 2024****, com referência* ***CIBSFM&HCM/37/2024.***
2º O CIBS FM&HCM informa que prorroga o prazo do protocolo e a validade do mesmo passa para o dia ***06 de Junho de 2027.***
3º Um mês antes dessa data, o Investigador deve enviar um pedido de renovação se necessitar.
4º Recomenda-se aos investigadores que mantenham o CIBS informado do decurso do estudo no mínimo uma vez ao ano.

E emite
RESULTADO: ***APROVADA A PRIMEIRA RENOÇÃO AO PROTOCOLO***

CIBS FM&HCM

Assinado em Maputo aos, 05 de Junho de 2026

Anexo 3. Resultado da identificação Bioquímica do isolado 8925AC, realçando a baixa discriminação.

University Eduardo Mondlane - Maputo

APIWEB™

API 20 E V5.0 | Printout | Export | New test | Modify

REFERENCE: 8923-AC

DATE: 7/30/23

COMMENT:

LOW DISCRIMINATION

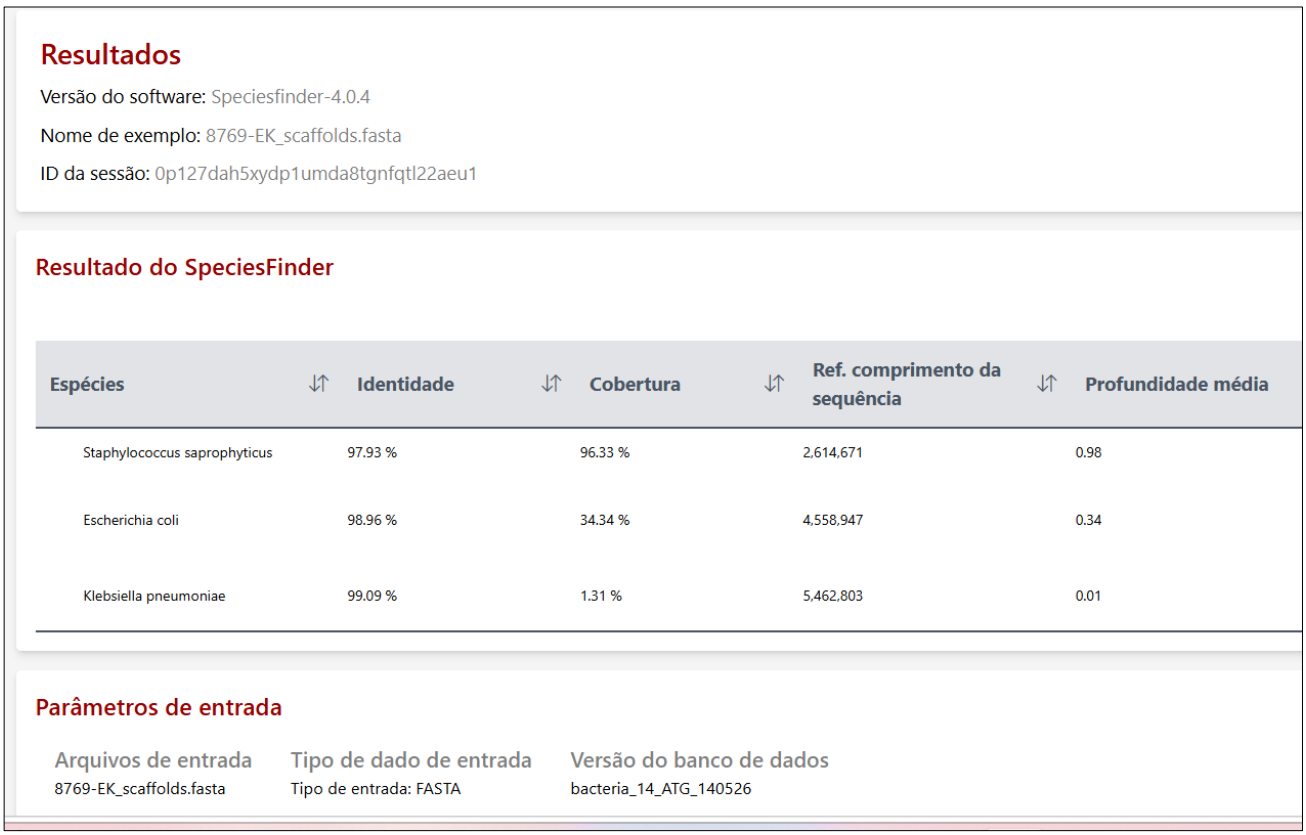
Strip	API 20 E V5.0
Profile	0001000
Note	POSSIBILITY OF Acinetobacter baumannii/calcoaceticus
	POSSIBILITY OF Brucella spp

Significant taxa	% ID	T	Tests against					
Pseudomonas oryzihabitans	39.8	0.77	CIT	89%	VP	25%		
Ochrobactrum anthropi	20.1	0.72	VP	15%	OX	90%		
Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp	18.8	0.71	VP	25%	OX	95%		
Non-fermenter spp	17.9	0.7	VP	15%	OX	93%		

Next taxon	% ID	T	Tests against					
Pasteurella pneumotropica/Mannheimia haemolytica	2.8	0.69	VP	7%	OX	80%		

Complementary test(s)	OF/O	Tween 80	dGLUCOSEa	42°C
Ochrobactrum anthropi	47%	-	+	-(+)
Bordetella spp	0%	-	2%	+(-)
Alcaligenes spp	0%	-	-(+)	-(+)
Moraxella spp	0%	v	2%	v
Brucella spp	0%	NT	NT	-
Pseudomonas oryzihabitans	98%	2%	98%	2%
Acinetobacter baumannii	98%	100%	-(+)	+
Acinetobacter calcoaceticus	98%	100%	-(+)	-
Non-fermenter spp	48%	+(-)	+(-)	+(-)

Anexo 4. Análise genómica *in silico* do isolado 8769 EK com identificação inconclusiva.



Resultados

Versão do software: Speciesfinder-4.0.4

Nome de exemplo: 8769-EK_scaffolds.fasta

ID da sessão: 0p127dah5xydp1umda8tgnfqtl22aeu1

Resultado do SpeciesFinder

Espécies	Identidade	Cobertura	Ref. comprimento da sequência	Profundidade média
Staphylococcus saprophyticus	97.93 %	96.33 %	2,614,671	0.98
Escherichia coli	98.96 %	34.34 %	4,558,947	0.34
Klebsiella pneumoniae	99.09 %	1.31 %	5,462,803	0.01

Parâmetros de entrada

Arquivos de entrada	Tipo de dado de entrada	Versão do banco de dados
8769-EK_scaffolds.fasta	Tipo de entrada: FASTA	bacteria_14_ATG_140526