

**ROGÉRIO HAKIO KUBOYAMA**

**Detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em pacientes assistidos em hospitais terciários na cidade de Campinas: epidemiologia molecular e fatores de risco.**

CAMPINAS

2009

**ROGÉRIO HAKIO KUBOYAMA**

**Detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em pacientes assistidos em hospitais terciários na cidade de Campinas: epidemiologia molecular e fatores de risco.**

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do  
título de Doutor em Clínica Médica  
Área de concentração: Ciências Básicas

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Luiza Moretti

CAMPINAS

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8<sup>o</sup>/ 6044

- K951d Kuboyama, Rogério Hakio  
Detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em pacientes assistidos em hospitais terciários na cidade de Campinas: epidemiologia molecular e fatores de risco / Rogério Hakio Kuboyama. Campinas, SP : [s.n.], 2009.
- Orientador: Maria Luiza Moretti  
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Eletroforese em gel de campo pulsado. 3. Plasmídeos. 4. Fatores de risco. 5. Epidemiologia molecular. 6. Infecção hospitalar. 7. Beta-lactamases. I. Moretti, Maria Luiza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

---

**Banca examinadora da tese de Doutorado**  
Rogério Hakio Kuboyama

---

---

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza Moretti

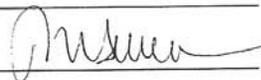
---

---

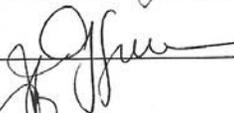
**Membros:**

---

1. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Aparecida Shikanai Yasuda



2. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Graziela Hanna Pereira

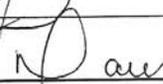


3. Prof. Dr. Francisco Hideo Aoki

4. Prof. Dr. Tomomasa Yano



5. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza Moretti



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 26/02/2009

---

***DEDICATÓRIA***

Aos meus pais Ichiro (in memoriam) e Satsue e aos meus irmãos e irmãs

## **AGRADECIMENTOS**

---

Um trabalho como este, não se faz numa única etapa. São meses de planejamento, ensaios, repetições, agendamentos, esperas, consultas, leituras, frustrações, formações, surpresas e emoções. E a cada momento a grata satisfação de poder conhecer novas pessoas, novos profissionais. Ao final, ao olhar a “obra” finalizada, vem a importante percepção de que não foram somente as minhas ações que permitiram com que neste volume contivesse começo, meio e fim. E a famosa frase “e a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho se realizasse” torna-se mais que verdadeira. Inesquecíveis na minha memória, como são todos os professores que um dia ensinaram-me os primeiros traços para a iniciação à leitura ou que fizeram com que eu pudesse revelar o outro lado do “=”, possibilitando-me a descoberta de um universo que a cada dia se abre diante de mim, encantando-me. Pessoas que contribuíram diretamente me ajudando. Pais, irmãos, amigos. Pacientes que nos seus esforços, nas filas, pelos hospitais, me faziam acreditar que a frustração de um gel insatisfatório era *nada* perto das suas morbidades... e o no outro dia um recomeço, que às vezes se iniciava com a inspiração de tantas melodias ouvidas ou leituras belíssimas decifradas. A estes artistas, meus agradecimentos. A Deus, pela oportunidade de continuar meu caminho, com um pouco de tudo isso e pela noção de que há tanto ainda a aprender nesta infinita harmonia da natureza que mesmo totalmente não conhecida faz-se referida como *Vida*.

À Professora Dra. Maria Luiza Moretti, pela ajuda na orientação, formação e pelo exemplo edificante.

Aos profissionais do laboratório de Epidemiologia Molecular, Éri van Olinda Ribeiro e Márcia Maria Pedroso, pelo apoio, ajuda e companhia.

Aos colegas de Pós-Graduação com os quais convivi. Pela amizade e carinho e pelos ensinamentos.

À equipe do Sistema de Arquivos Médicos da UNICAMP e Hospital Municipal Dr Mário Gatti, pela solicitude e pelo empenho na localização dos prontuários e registros.

À equipe de profissionais do Apoio Didático Científico e Computacional da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial ao grupo da Câmara de Pesquisa – Estatística.

Aos funcionários da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

À equipe de profissionais do Hospital Municipal Dr Mario Gatti, colegas do trabalho diário.

Ao Orlando José Bratfich, à Diva Baroni e Márcia Luiz da Silva Gomes pela convivência e atividades conjuntas no laboratório de microbiologia.

Gostaria de reiterar meus agradecimentos ao meu pai, Ichiro, à minha mãe, Satsue e a todos os meus irmãos pela convergência de esforços e incentivos e pela diversidade de histórias e cores que cada um imprimiu na minha aquarela.

*“-Quand je tire mon archet, c’est un petit morceau de mon coeur vivant que je déchire. Ce que je fais, ce n’est que la discipline d’une vie où aucun jour n’est férié. J’accomplis mon destin.”*

**Touts les matins du monde,**  
de Pascal Quignard

	Página
<b>RESUMO</b> .....	xxxvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xli
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	45
1.1. Histórico.....	47
1.2. Estratégias de classificação.....	53
1.3. Beta-lactamases de espectro estendido.....	55
1.4. Aspectos epidemiológicos da colonização e infecção por <i>K. pneumoniae</i> .....	62
1.5. Métodos moleculares para tipagem de microrganismos com finalidades epidemiológicas.....	72
1.6. Métodos moleculares aplicados em estudo de patógenos hospitalares.....	72
1.6.1. Métodos com base no estudo do DNA genômico.....	72
1.6.2. Métodos fenotípicos com base no estudo das proteínas.....	73
1.7. Métodos genotípicos.....	74
1.7.1. Técnica para análise plasmidial.....	74
1.7.2. Técnica eletroforética para análise do DNA cromossômico.....	74
1.7.3. Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição de clivagem frequente e eletroforese convencional.....	75
1.7.4. Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição e PFGE.....	76
<b>2. JUSTIFICATIVA PARA DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO PROPOSTO</b> .....	79
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	83
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	87
4.1. População de estudo.....	89
4.2. Métodos aplicados.....	89
4.2.1. Análise microbiológica.....	89
4.2.2. Desenho do estudo.....	89
4.2.3. Critérios de exclusão.....	90
4.2.4. Critérios de inclusão.....	91
4.2.5. Coleta de dados.....	91

4.2.6. Detecção das cepas de <i>K. pneumoniae</i> possivelmente produtoras de ESBLs.....	91
4.2.7. Teste confirmatório para a detecção das cepas de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBLs.....	92
4.2.8. Preparo das placas para a aplicação dos discos contendo antibióticos....	92
4.2.9. Preparo do inóculo.....	93
4.2.10. Semeadura das placas.....	93
4.2.11. Variáveis e conceitos.....	93
4.2.12. Aplicação dos discos.....	93
4.2.13. Controle de qualidade.....	94
4.2.14. Aquisição dos discos contendo a combinação com ácido clavulânico.	95
4.2.15. Análise do DNA plasmidial.....	95
4.2.16. Análise do DNA cromossômico por PFGE.....	96
4.2.17. Processamento e análise dos dados obtidos da PFGE.....	99
4.2.18. Análise estatística.....	99
<b>5. ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>100</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
6.1. Detecção de cepas produtoras de ESBLs.....	103
6.1.1. Testes de triagem para a identificação das prováveis cepas produtoras de ESBLs.....	103
6.1.1.1. Teste de aproximação de discos (sinergismo).....	103
6.1.1.2. Mensuração do diâmetro da zona de inibição.....	103
6.1.2. Testes confirmatórios da produção de ESBLs.....	104
6.2. Espécimens clínicos.....	106
6.3. Especialidades médicas.....	107
6.4. Evolução.....	108
6.5. Análise do DNA cromossômico por PFGE.....	116
6.6. Análise do DNA plasmidial.....	120
6.7. Fatores de risco.....	126
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>131</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>149</b>

<b>9. ORÇAMENTO.....</b>	<b>153</b>
<b>10. CRONOGRAMA.....</b>	<b>157</b>
<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>161</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>189</b>
Anexo I: Ficha para a coleta de dados de pacientes com IH por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	191
Anexo II: Ficha para coleta de dados, referente aos testes de triagem (detecção de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> possivelmente produtoras de ESBLs).....	192
Anexo III: Ficha para coleta de dados, referente ao teste confirmatório (detecção de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBLs).....	192
Anexo IV: Preparo de uma suspensão de BaSO <sub>4</sub> equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland (Koneman <i>et al.</i> , 2006).....	192
Anexo V: Variáveis e conceitos.....	193
Anexo VI: Interpretação dos valores do diâmetro do halo de inibição para diferentes antibióticos.....	197
Anexo VII: Considerações gerais sobre o clavulanato de potássio, de acordo com a farmacopéia americana (USP - <i>United States Pharmacopeia</i> , 2000).....	197
Anexo VIII - Soluções Utilizadas (dispostas em ordem alfabética).....	198
Anexo IX: Fatores de risco envolvendo infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> em trabalhos internacionais.....	202

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

$\beta$	beta
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
&	e
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
<i>p</i> CMB	para-cloromercuriobenzoato
ATAB	brometo de alquil trimetil amônio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BaSO <sub>4</sub>	sulfato de bário
BHI	infusão de cérebro e coração
CHEF-DR II	<i>contour-clamped homogeneous electric field</i>
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
cm	centímetro
Cr	DNA cromossômico
DDAT	teste de aproximação de discos
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio-padrão
e cols.	e colaboradores
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ESBLs	beta-lactamases de espectro estendido
<i>et al.</i>	entre outros
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
g	grama
HC	Hospital de Clínicas
HMMG	Hospital Municipal Dr. Mario Gatti - Campinas

IC	intervalo de confiança
kb	kilobases
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LCR	<i>ligase chain reaction</i>
M	molaridade
mg	miligrama
mm	milímetro
mL	mililitro
mM	milimolar
<i>MW</i>	marcador de peso molecular <i>lambda ladder</i>
N	número de casos
NaCl	cloreto de sódio
NISS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NV	não visualizados plasmídios
OMP	proteínas de membrana externa
OR	<i>odds ratio</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pág	página
Pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCR-SSCP	<i>Polymerase Chain Reaction – strand conformational polymorphism analysis</i>
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i>
PBP	proteína de ligação da penicilina
pI	ponto isoelétrico
qsp	quantidade suficiente para
REA	<i>restriction endonuclease analysis</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphisms</i>
RNA	ácido ribonucléico

rpm	rotações por minuto
SAME	sistema de arquivos médicos
SAS	<i>statistical analysis system</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SHV	<i>sulphydryl variable</i>
SpeI	enzima de restrição isolada de <i>Sphaerotilus species</i> ATCC 13923
UPGMA	<i>unweighted-pair group method</i>
UTI	unidade de terapia intensiva
UFC	unidades formadoras de colônia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

## LISTA DE TABELAS

---

	Página
TABELA 1	Esquemas de classificação para beta-lactamases bacterianas..... 52
TABELA 2	Distribuição geográfica das ESBLs mais dispersas entre os isolados clínicos pertencentes à família <i>Enterobacteriaceae</i> ..... 62
TABELA 3	Frequência de ocorrência de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBL no Brasil..... 67
TABELA 4	Frequência de ocorrência de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em vários países..... 69
TABELA 5	Concentração dos diferentes antibióticos e valores dos halos de inibição para a identificação das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> possivelmente produtoras de ESBLs..... 92
TABELA 6	Valores dos intervalos permitidos para o diâmetro dos halos de inibição, utilizando cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853..... 95
TABELA 7	Situação das cepas de <i>K. pneumoniae</i> localizadas para inclusão no presente trabalho..... 103
TABELA 8	Frequência de isolamento de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e espécimens clínicos..... 107
TABELA 9	Características demográficas gerais da população de estudo..... 109
TABELA 10	Perfis plasmidiais das 65 cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> das quais foi possível a visualização de plasmídios..... 122
TABELA 11	Sumário das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de beta-lactamases de espectro estendido isoladas de pacientes com infecção nosocomial..... 123
TABELA 12	Sumário das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> não produtoras de beta-lactamases de espectro estendido isoladas de pacientes com infecção nosocomial..... 124
TABELA 13	Característica dos pacientes com infecção por cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBLs..... 126

TABELA 14	Análise univariada do número de pacientes recebendo terapia antimicrobiana antes da data do primeiro isolamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> do espécimen clínico.....	127
TABELA 15	Análise univariada do número de dias sob terapia antimicrobiana anterior à data de isolamento primário de <i>Klebsiella pneumoniae</i> da amostra clínica.....	128
TABELA 16	Resultado da análise multivariada usando modelo de regressão logística do tipo <i>stepwise</i> para a identificação de fatores de risco independentes para a aquisição de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBLs.....	129

## LISTA DE FIGURAS

---

		Página
FIGURA 1	Detecção presuntiva da produção de ESBLs pelo método de aproximação de discos (sinergismo).....	105
FIGURA 2	Teste confirmatório da produção de ESBLs.....	105
FIGURA 3	Diferentes perfis de DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsátil de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBLs após a digestão com SpeI.....	117
FIGURA 4	Dendrograma das 32 cepas clínicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBLs baseado nos resultados da eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e no coeficiente de similaridade de Dice. As cepas foram agrupadas segundo o método UPGMA ( <i>unweighted-pair group method</i> ) utilizando média aritmética. A escala indica a percentagem de similaridade genética.....	118
FIGURA 5	Dendrograma das 89 cepas clínicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> baseado nos resultados da eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e no coeficiente de similaridade de Dice. As cepas foram agrupadas segundo o método UPGMA ( <i>unweighted-pair group method</i> ) utilizando média aritmética. A escala indica a percentagem de similaridade genética.....	119
FIGURA 6	Dez diferentes perfis plasmidiais de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> <b>produtoras</b> de ESBLs obtidas de pacientes durante o período de estudo.....	121
FIGURA 7	Diferentes perfis plasmidiais de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> <b>não</b> produtoras de ESBLs obtidas de pacientes durante o período de estudo.....	121

*LISTA DE QUADROS*

---

	Página
QUADRO 1 Características das técnicas de tipagem molecular baseadas no DNA.....	73

## LISTA DE GRÁFICOS

---

	Página
GRÁFICO 1	Número de espécimens clínicos dos quais foram isoladas cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..... 106
GRÁFICO 2	Número de pacientes com infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> segundo as diferentes especialidades médicas..... 108
GRÁFICO 3	Evolução clínica dos pacientes com infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..... 108
GRÁFICO 4	Tempo médio de internação (dias) de pacientes com infecção nosocomial por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ( $P$ valor=0,4593)..... 110
GRÁFICO 5	Distribuição dos pacientes com infecção nosocomial por <i>Klebsiella pneumoniae</i> segundo o gênero..... 110
GRÁFICO 6	Distribuição dos pacientes com infecção nosocomial por <i>Klebsiella pneumoniae</i> segundo a média e a mediana de idade..... 111
GRÁFICO 7	Tempo médio (dias) de internação até o diagnóstico de infecção nosocomial por <i>Klebsiella pneumoniae</i> considerando os diversos espécimens clínicos..... 111
GRÁFICO 8	Tempo médio de permanência hospitalar (dias), considerando o sítio de infecção..... 112
GRÁFICO 9	Uso prévio de antibióticos em pacientes com infecção nosocomial por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..... 113
GRÁFICO 10	Média do número de antibióticos consumidos previamente à infecção nosocomial por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ( $P$ valor=0,0017)..... 113
GRÁFICO 11	Número de pacientes com infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> sob antibioticoterapia prévia..... 114
GRÁFICO 12	Média de dias em uso prévio de antibióticos..... 115

## ***RESUMO***

Os objetivos do presente estudo, conduzido retrospectivamente, utilizando cepas isoladas de espécimens clínicos obtidos de pacientes internados em dois hospitais brasileiros entre fevereiro de 2001 e junho de 2004 foram descrever: a presença de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), o melhor método e o substrato preferido para os testes de triagem e de confirmação da produção de ESBLs, a relação epidemiológica das cepas obtidas e analisar os fatores de risco para infecção por cepa produtora de ESBLs. A fim de investigar a relação genética das cepas, foram utilizadas as análises do DNA plasmidial e do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsátil (PFGE). Um total de 89 cepas de *K. pneumoniae* foram coletadas de diversos sítios anatômicos. Os espécimens clínicos mais comuns dos quais foram isoladas cepas produtoras foram urina (12,4%) e sangue (10,1%). Utilizando os critérios estabelecidos pelo CLSI (testes de triagem), 35 (39,3%) cepas de *K. pneumoniae* foram consideradas possivelmente produtoras de ESBLs, enquanto que o teste de aproximação de discos (DDAT) revelou distorções características nas zonas de inibição produzidas pela molécula do clavulanato em 96, 62,5, 50, 18,8 e 12,5% das cepas ao redor dos discos contendo aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefpodoxima, respectivamente. Das 89 cepas, 32 (36%) foram consideradas produtoras de ESBLs baseadas no teste confirmatório pelo método Oxoid de discos-combinados. O disco contendo cefotaxima foi capaz de confirmar 100 % dos produtores de ESBLs enquanto que o disco contendo ceftazidima deixou de confirmar 2 cepas produtoras. Dez e 32 diferentes perfis plasmidiais foram observados dentre as cepas de *K. pneumoniae* produtoras e não produtoras, respectivamente. A PFGE demonstrou melhor poder discriminatório fornecendo 15 e 55 perfis de DNA cromossômico dentre as cepas ESBLs-positivas e ESBLs-negativas, respectivamente.

Da análise univariada, as variáveis significativamente associadas com infecção por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs foram: uso de cefalosporinas de quarta geração, de lincosamida, de carbapenêmicos, de glicopeptídeos, cirurgia recente, traqueostomia, idade, dias em uso de lincosamida, dias em uso de glicopeptídeos, número total de antibióticos e duração da terapia antimicrobiana. Ao realizar a análise multivariada, utilizando um modelo de regressão logística que incluía as variáveis estatisticamente significantes da análise univariada ( $P < 0,05$ ), número total de antibióticos permaneceu

como única variável independente para infecção por cepa de *K. pneumoniae* produtora de ESBLs (OR, 1,60; IC95%, 1,194-2,145.;  $P = 0,0017$ ).

Os dados obtidos revelam: uma taxa relativamente alta da produção de ESBLs em cepas de *K. pneumoniae* obtidas de pacientes das instituições estudadas; a insuficiência da análise plasmidial na elucidação da relação genética dentre as cepas produtoras de ESBLs; aztreonam como melhor substrato indicador da produção presuntiva de ESBLs e cefotaxima como o melhor substrato no teste confirmatório pelo método Oxoid de discos-combinados.

# ***ABSTRACT***

The objectives of this study conducted retrospectively using strains isolated from clinical specimens obtained from patients hospitalized in two Brazilian hospitals between February 2001 to June 2004 were to describe the presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* strains, the best method and the preferred substrate for screening and confirming ESBL production and the epidemiological relatedness of ESBL-producing strains and analyse the risk factors for infection due to ESBL-producing *K. pneumoniae*. To investigate the genetic relatedness of the strains, plasmid analysis and chromosomal DNA analysis by pulsed-field gel electrophoresis were used. A total of 89 *K. pneumoniae* were collected from diverse body sites. The most common specimens yielding ESBL-producing strains were urine (12.4%) and blood (10.1%). Using CLSI criteria (ESBL screening breakpoints), 35 *K. pneumoniae* (39.3%) had presumptive ESBL phenotype, while using the double-disk approximation test (DDAT) characteristic clavulanate-induced distortions of inhibition zones were found in 96, 62.5, 50, 18.8 and 12.5% of the strains around the disks containing aztreonam, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone and cefpodoxime, respectively. Of 89 isolates, 32 (36%) produced ESBL based on the confirmatory Oxoid combination disk method. The disk containing cefotaxime was able to confirm 100% of the ESBL producers while the disk containing ceftazidime was not able to confirm 2 ESBL-positive strains. Ten and 32 different plasmid profiles were observed among the ESBL-producing *K. pneumoniae* and non ESBL producers, respectively. Pulsed-field gel electrophoresis showed the best discriminatory power giving 15 and 55 different chromosomal DNA profiles among the ESBL-positive and ESBL-negative *K. pneumoniae*, respectively.

From univariate analysis, variables significantly associated with infection by an ESBL-producing strain of *K. pneumoniae* included the following: use of 4st-generation cephalosporins, lincosamide, carbapenems, glycopeptides, recent surgery, tracheostomy, age, days in using of lincosamide, days in using of glycopeptides, total number of antibiotics and duration of the antimicrobial therapy. The only variable that remained independent risk factor for acquiring infection due to ESBL-producing *K. pneumoniae* after multivariable analysis using a logistic regression model, which included the variables associated with acquiring infection by ESBL-producing *K. pneumoniae* by univariate

analysis ( $P < 0.05$ ), was total number of antibiotics (OR, 1.60; 95%CI, 1.194-2.145;  $P = 0.0017$ ).

In summary, these data indicate that ESBL-producing *K. pneumoniae* occur at a relatively high incidence at our institutions and the plasmid analysis is not sufficient to identify relationships between ESBL-producing strains of *K. pneumoniae*. The ESBL screening breakpoints and DDAT with aztreonam appear to be good indicators in presumptive detection of ESBL-producing strains and the cefotaxime used in the Oxoid combination disk method constituted the best substrate in the confirmatory test.

## ***1. INTRODUÇÃO***

## 1.1. Histórico

A palavra antibiótico, resultante da combinação de duas palavras gregas *anti* + *bio* e significando literalmente “contrário à vida” foi criada por Paul Vuillemin, em 1889. Atualmente, os antibióticos são definidos como compostos químicos específicos derivados de organismos vivos ou produzidos por eles, bem como seus análogos estruturais obtidos por síntese, capazes de inibir processos vitais de outros organismos, mesmo em concentrações diminutas. O fato de bactérias e fungos sobreviverem diante da competição por alimento é devido à capacidade de produzirem substâncias que se alastram, destroem ou inibem o crescimento de outras espécies. Esse fenômeno é conhecido como antibiose, e as substâncias, são os antibióticos. O fenômeno da antibiose só foi cientificamente estudado após o estabelecimento das bases da bacteriologia por Pasteur (1822-1895), mas o emprego empírico de fungos, hoje reconhecidos como fonte de antibióticos, é muito antigo sendo que a medicina popular já recorria a eles séculos antes de nossa era (Korolkovas, 1988).

Em 1877, Pasteur e Joubert relataram a inibição do crescimento do *Bacillus anthracis* por cultura líquida de bactérias aeróbias. Em 1929, Sir Alexander Fleming (1881-1955) observou a ação inibidora do fungo contaminante *Penicillium notatum*, no crescimento de uma cultura de estafilococos, publicando a seguir suas observações. Sua descoberta não teve aplicação prática imediata, pois ele não fora capaz de isolar a penicilina, o agente responsável pela atividade inibidora, ou de produzi-la com bons rendimentos. Tal tarefa coube a Sir Howard Florey e Sir Ernst Chain, de Oxford (Inglaterra), que isolaram a penicilina em 1940, demonstrando o seu extraordinário valor terapêutico: “the most potent weapon” até então conhecido na luta contra as infecções (Bier, 1990).

Acompanhando a descoberta da ocorrência natural das penicilinas, observou-se também a detecção das enzimas que as hidrolisavam, formando produtos inertes. Inicialmente tais enzimas foram chamadas de penicilinasas e subsequentemente receberam a denominação de beta-lactamases (Bush e Sykes, 1986).

Abraham e Chain, nos anos 40 já haviam observado a resistência mediada por beta-lactamase, antes mesmo do amplo uso clínico da penicilina no tratamento das infecções bacterianas (Bush, 1989a; Blomberg *et al.*, 2005). Nos anos que se seguiram foi possível observar o estabelecimento de resistência, notavelmente em cepas de *Staphylococcus*

*aureus*, podendo citar também o aparecimento de resistência em outras bactérias como *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, nos anos 70 e em *Enterococcus faecalis*, nos anos 80. Alguns patógenos podiam desenvolver a resistência através de mutações que causavam a síntese de uma expressiva quantidade de enzimas. Com isso, era possível a inativação do substrato destas enzimas: os antibióticos (Philippon, Labia e Jacoby, 1989).

A introdução das cefalosporinas e das penicilinas de amplo espectro, em meados dos anos 60 forneceu os substratos necessários para a detecção de uma ampla variedade de beta-lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas. Com a introdução de novas penicilinas e cefalosporinas, bem como as cefamicinas, as combinações do tipo amoxicilina com ácido clavulânico, os carbapenêmicos e os monobactâmicos, houve o aparecimento também de uma ampla variedade de beta-lactamases (Bush e Sykes, 1986).

Assim, beta-lactamases são enzimas bacterianas que podem ser codificadas por genes plasmidiais ou cromossômicos, com capacidade de hidrolisar os antibióticos beta-lactâmicos inativando-os (Payne *et al.*, 1994). A resistência a antibióticos beta-lactâmicos foi demonstrada em *Escherichia coli* mesmo antes da liberação da penicilina para uso terapêutico. Nos anos de 1960 a primeira beta-lactamase mediada por plasmídio passível de transferência foi descoberta e denominada TEM-1, iniciais de *Temoniera*, nome de uma garota grega da qual se isolou a bactéria *E. coli* produtora da enzima (Blomberg *et al.*, 2005).

As beta-lactamases mediadas por plasmídios são passíveis de rápida transferência entre os gêneros bacterianos e conseqüentemente constituem uma importante ameaça ao sucesso dos agentes beta-lactâmicos em uso (Payne *et al.*, 1994). Mais de 30 beta-lactamases mediadas por plasmídios têm sido distinguidas com base em critérios como perfil diante de certos substratos, reações com inibidores e determinação do ponto isoelétrico (Philippon, Labia e Jacoby, 1989).

Grande parte das bactérias aeróbias gram-negativas possui beta-lactamases cromossômicas, cuja produção pode ser induzível transitoriamente ou permanentemente. Quando transitoriamente induzida a produção das beta-lactamases aumenta enquanto houver a permanência do agente indutor. Por outro lado, num estado de indução permanente (mutação, por exemplo), a produção de beta-lactamases permanecerá aumentada mesmo quando o agente indutor não estiver mais presente (Gustaferrero e

Steckelberg, 1991). Ainda, muitas bactéria entéricas possuem enzimas cromossômicas do tipo constitutivo, que por sua vez são produzidas em baixos níveis e variam com a espécie bacteriana.

Uma variedade de esquemas de classificação de beta-lactamases foi desenvolvida ao longo da história destas enzimas, levando a confusões de nomenclatura (Tabela 1). Dentre os vários esquemas de classificação podemos citar o fornecido por Richmond e Sykes, o de Ambler e a recente classificação das beta-lactamases segundo o esquema de Bush-Jacoby-Medeiros (Koneman *et al*, 2006).

A classificação das beta-lactamases tendo como base o critério **funcional** começou quando as cefalosporinases (beta-lactamases com expressivo padrão de hidrólise sobre cefalosporinas), foram diferenciadas das penicilinases (enzimas de importante atividade hidrolítica sobre a penicilina). Dentre os esquemas de classificação funcional que foram aceitos entre os pesquisadores de beta-lactamases podemos citar:

a) a classificação de Sawai e cols., em 1968, descrevendo as penicilinases e as cefalosporinases e utilizando a resposta a anti-soros como um discriminador adicional;

b) o esquema de Richmond e Sykes, em 1973, que incluía todas as beta-lactamases isoladas de microrganismos gram-negativos descritas naquela época, classificando as enzimas em cinco grupos mais importantes com base no perfil do substrato empregado;

c) o esquema ampliado de Richmond e Sykes, elaborado por Sykes e Matthew, em 1976, que enfatizava as beta-lactamases mediadas por plasmídios que podiam ser diferenciadas pela focalização isoelétrica;

d) o esquema proposto por Mitsuhashi e Inoue, em 1981, no qual a categoria “beta-lactamase cefuroxima-hidrolisante” foi adicionada à classificação de “penicilinase e cefalosporinase”;

e) os grupos propostos por Bush, em 1989, que incluíam enzimas de todas as fontes bacterianas, sendo este o primeiro esquema a tentar correlacionar o substrato e as propriedades inibidoras de certos agentes químicos com a estrutura molecular (Bush, Jacoby e Medeiros., 1995).

As classificações com base nas **estruturas moleculares** foram primeiramente propostas por Ambler, em 1980, quando somente quatro sequências de aminoácidos de

beta-lactamases eram conhecidas. Naquela época, a única classe de enzima contendo serina foi designada beta-lactamase da classe A, que incluía a penicilinase PC1 de *S. aureus*, ao contrário da metalo-beta-lactamase da classe B de *Bacillus cereus*. As cefalosporinases da classe C foram descritas por Jaurin e Grundstrom, em 1981 e as enzimas oxacilina-hidrolisantes da classe D foram segregadas das outras beta-lactamases contendo serina, no final dos anos 80 (Ambler, 1980; Bush, Jacoby e Medeiros, 1995). Beta-lactamases das classes A, C (AmpC) e D possuem um resíduo contendo serina nos seus sítios ativos, ao passo que as beta-lactamases da classe B são metalo-enzimas, sendo necessária a molécula de zinco para suas atividades. As beta-lactamases da classe A, que são predominantemente representadas pelas famílias de enzimas TEM e SHV (codificadas por plasmídios) constituem o grupo molecular mais comum dentre as beta-lactamases produzidas por enterobactérias, como *E. coli* e *K. pneumoniae* (Yu, Chuang e Walther-Rasmussen, 2006).

Como no esquema de Bush, de 1989, que correlacionava substrato, propriedade inibidora e estrutura molecular, quatro grupos de beta-lactamases são designados pela classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (1995):

Beta-lactamases do grupo 1: incluem as cefalosporinases que não são bem inibidas pelo ácido clavulânico;

Beta-lactamases do grupo 2: incluem as beta-lactamases que são geralmente inibidas pelos inibidores de beta-lactamases e que pertencem às classes moleculares A ou D;

Beta-lactamases do grupo 3: incluem as metalo-beta-lactamases que são fracamente inibidas por todos os inibidores clássicos de beta-lactamases, com exceção do EDTA e do *p*-cloromercuriobenzoato (*p*CMB);

Beta-lactamases do grupo 4: incluem as penicilinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995).

Como o número de beta-lactamases derivadas das enzimas TEM e SHV continuava a aumentar, houve a decisão de classificar tais beta-lactamases-derivadas em grupos que mantivessem o prefixo “2b”. Em substituição à designação do antigo grupo 2b’, as beta-lactamases de espectro estendido foram posicionadas no grupo 2be, mostrando assim que estas enzimas são derivadas das enzimas do grupo 2b e que possuem um espectro estendido de atividade. Da mesma forma, levando-se em consideração o critério estrutural, as beta-

lactamases derivadas do grupo 2b com afinidade reduzida aos inibidores de beta-lactamases foram posicionadas em um novo grupo, designado 2br. O terceiro grupo de enzimas adicionado ao esquema foi o das beta-lactamases pertencentes ao grupo 2f que inclui as enzimas carbapenem-hidrolisantes e que são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e, de acordo com pesquisas recentes, sabe-se agora que tais enzimas contêm um sítio ativo contendo serina (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995).

**Tabela 1:** Esquemas de classificação para beta-lactamases bacterianas.

Classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Grupo)	Classificação de Bush, de 1989 (Grupo)	Classificação de Richmond-Sykes (Classe)	Classificação de Mitsuhashi-Inoue (Tipo)	Classificação molecular (Classe)	Substratos preferidos	Inibição por:		Enzimas representativas
						CA	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC de bactérias gram negativas; MIR-1; Penicilinases de bactérias gram-positivas; TEM-1; TEM-2; SHV-1; TEM-3 à TEM-26; SHV-2 à SHV-6; K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i> TEM-30 à TEM-36; TRC-1; PSE-1; PSE3; PSE-4; OXA-1 à OXA-11; PSE-2 (OXA-10)
2a	2a	Não incluída	PCase V	A	Penicilinas	+	-	Cefalosporinases induzíveis de <i>Proteus vulgaris</i> NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> ; Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i> L1 de <i>Xanthomonas maltophilia</i> ; CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i> Penicilinase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
2b	2b	III	PCase I	A	Penicilinas, Cefalosporinas	+	-	
2be	2b'	Não incluída	CXase	A	Penicilinas, Cefalosporinas de amplo e restrito espectros, Monobactâmicos	+	-	
2br	Não incluída	Não incluída	Não incluída	A	Penicilinas	±	-	
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicilinas, carbenicilina	+	-	
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicilinas, Cloxacilina	±	-	
2e	2e	Ic	CXase	A	Cefalosporinas	+	-	
2f	Não incluída	Não incluída	Não incluída	A	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenens	+	-	
3	3	Não incluída	Não incluída	B	Grande parte dos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenens	-	+	
4	4	Não incluída	Não incluída	ND	Penicilinas	-	?	

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. (1995).

Legenda: CSase, cefalosporinase; PCase, penicilinase; CXase, beta-lactamases cefuroxima-hidrolisantes; ND, não determinada.

## 1.2. Estratégias de Classificação

De acordo com Bush e cols., (1995) as enzimas foram primeiramente categorizadas de acordo com as suas características de inibição ante o quelante de metal **EDTA**. As beta-lactamases inibidas pelo EDTA, foram dispostas no grupo 3, um grupo compreendendo somente um pequeno número de beta-lactamases.

Com a separação das assim chamadas metaloenzimas das demais beta-lactamases, as enzimas foram agrupadas de acordo com os resultados obtidos após os ensaios com diferentes substratos. Primeiramente, a velocidade de hidrólise relativa da **benzilpenicilina** e da **cefaloridina** foi avaliada para poder classificar a enzima em estudo como **penicilinase** ou **cefalosporinase**. Porém, se determinada enzima hidrolisasse um destes substratos a uma velocidade relativa de aproximadamente 30% a menos do que aquela observada para o outro beta-lactâmico, então a enzima era classificada como pertencente tanto à categoria das penicilinases como das cefalosporinases. Certas cefalosporinases, no entanto, hidrolisavam a benzilpenicilina mas não hidrolisavam nenhuma outra penicilina. Com base nesta atividade e nas diferentes respostas microbiológicas às penicilinas e às cefalosporinas, tais enzimas foram reunidas no grupo 1.

Foram consideradas **enzimas de espectro estendido** as enzimas que hidrolisavam os dois substratos a velocidades aproximadamente equivalentes.

Subgrupos de enzimas foram posteriormente definidos pela análise das velocidades de hidrólise da **carbenicilina** ou da **cloxacilina** (ou ainda, da oxacilina) pelas penicilinases. Se a cloxacilina ou a oxacilina fosse hidrolisada a uma velocidade superior a 50% daquela observada para a benzilpenicilina, a enzima era classificada como pertencente ao grupo 2d, um grupo que podia também incluir enzimas que hidrolisassem a carbenicilina. Estas enzimas não eram tão bem inibidas pelo **ácido clavulânico** como o são a grande parte das beta-lactamases do grupo 2. Se a carbenicilina fosse hidrolisada a uma velocidade superior a 60% daquela observada para a benzilpenicilina e se a cloxacilina ou oxacilina fosse hidrolisada a uma velocidade inferior a 50% daquela observada para a benzilpenicilina, a enzima era classificada no grupo 2c.

Se as velocidades de hidrólise dos antibióticos beta-lactâmicos de espectro estendido (ceftazidima, cefotaxima ou aztreonam) fossem superiores a 10% daquelas observadas para a benzilpenicilina, a enzima era classificada no grupo 2be, grupo que

compreende as **beta-lactamases de espectro estendido** (ESBLs). Este grupo foi originalmente designado “beta-lactamases de amplo espectro estendido”, em referência às atividades de amplo espectro das penicilinas e das cefalosporinas. As cefalosporinas que hidrolisassem bem a **cefotaxima**, mas que não apresentassem boa atividade penicilina-hidrolisante e que fossem inibidas pelo ácido clavulânico foram classificadas no grupo 2e. Outras exceções foram feitas para a designação do grupo 2be. A decisão foi feita para incluir as beta-lactamases tais como TEM-7 e TEM-12 (enzimas resultantes de mutações pontuais nos genes TEM-2 e TEM-1, respectivamente). Mesmo assim, os critérios de hidrólise não se adequaram rigorosamente, pois aumentos consideráveis nas velocidades de hidrólise da ceftazidima foram notados, comparados com aqueles das enzimas progenitoras, o que resultou em valores de concentração inibitória mínima também aumentados quando comparados aos da cefalosporina para os microrganismos produtores da enzima TEM.

As características de inibição foram então examinadas. A inibição pelo **EDTA** classificava uma determinada enzima no grupo 3 (grupo das metalo-beta-lactamases). A inibição pelo inativador suicida **ácido clavulânico** foi uma característica essencial requerida para a avaliação da maioria das enzimas e, no caso das cefalosporinas, a inibição pela **cloxacilina** e o monobactâmico **aztreonam** frequentemente poderia ser correlacionada de maneira inversa. Assim, as cefalosporinas foram agrupadas em dois grupos: grupo 1 e grupo 2e. As enzimas do grupo 1 não foram bem inibidas pelo ácido clavulânico, mas foram frequentemente inibidas por uma baixa concentração de aztreonam ou cloxacilina. Já as cefalosporinas dos grupo 2e que foram inibidas pelo ácido clavulânico não apresentaram uma alta afinidade para o monobactâmico.

As penicilinas que não foram bem inibidas pelo ácido clavulânico foram classificadas no grupo 4. Apesar de quase todas as enzimas (com exceção de duas) terem velocidades de hidrólise para a cloxacilina, o que as classificaria no grupo 2d, a resistência à inibição pelo ácido clavulânico foi maior do que aquela vista para muitas das enzimas do grupo 2d. Por isso, essas enzimas permaneceram no grupo 4 até que alguma informação adicional (dados de sequenciamento, por exemplo) indicasse uma classificação mais adequada (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995).

### 1.3. Beta-Lactamases de Espectro Estendido

As mutações que ocorriam no cromossomo de certos patógenos, levando a resistência pela produção aumentada de beta-lactamases era observada nas bactérias com produção de beta-lactamase induzível (como *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*) e esta resistência não era transmissível (Kliebe *et al.*, 1985; Philippon, Labia e Jacoby, 1989). Conseqüentemente, foi com surpresa indesejável que cepas de *Klebsiella*, apresentando resistência às cefalosporinas de espectro estendido mediada por plasmídios foram isoladas (Philippon, Labia e Jacoby, 1989). Em 1983, Knothe e cols. descreveram pela primeira vez um tipo de resistência (transferível) às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens*, na Alemanha. Este novo fenótipo de resistência era devido à produção de uma beta-lactamase de espectro estendido denominada SHV-2, que se desenvolvera a partir da enzima SHV-1, naquela época já conhecida. Subseqüentemente, cepas produtoras de ESBLs derivadas de enzimas TEM e CTX-1 foram isoladas em vários hospitais franceses (Liu *et al.*, 1998). O primeiro surto infeccioso causado por bactérias produtoras de ESBLs derivadas de TEM-1 (TEM-3) foi relatado na França na década de 80 (Morris *et al.*, 2003). Desde então, evidencia-se um rápido aumento no número e na variedade de ESBLs. Da mesma forma, cepas bacterianas, especialmente *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs têm se disseminado ou, independentemente, têm evoluído por todo o mundo (Liu *et al.*, 1998; Mangeney *et al.*, 2000).

Posteriormente, descobriu-se que as novas enzimas que surgiam eram derivadas das beta-lactamases da classe A (segundo a classificação de Ambler), como TEM-1, TEM-2 (beta-lactamases comuns mediadas por plasmídios) e SHV-1, do termo inglês *sulphydryl variable* (enzima resultante da expressão de genes cromossômicos em *K. pneumoniae*) observadas nas bactéria gram-negativas (Philippon, Labia e Jacoby, 1989; Spanu *et al.*, 2002, Koneman *et al.*, 2006).

Naquela época, as enzimas detectadas mais comumente em isolados bacterianos clínicos como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* ocasionavam um expressivo grau de resistência à ampicilina, piperacilina, ticarcilina e cefalotina, e uma suscetibilidade reduzida ao aztreonam e às cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima. Por essa razão elas foram denominadas beta-lactamases de espectro estendido.

As cefamicinas, como cefoxitina, cefotetan e moxalactam e os carbapenêmicos, como imipenem, não eram afetados pelas ESBLs. Tais enzimas refletem o produto da expressão plasmidial ou ainda, da expressão cromossômica (Koneman *et al.*, 2006).

Pelo menos 340 beta-lactamases originárias de isolados clínicos foram descritas, com sequências únicas de aminoácidos ou perfil fenotípico diferenciado. Muitas destas enzimas pertencem a famílias muito relacionadas com funções similares (Bush, 2001). Mais de 60 tipos diferentes de beta-lactamases mediadas por plasmídios foram caracterizados. De forma didática, as beta-lactamases codificadas por plasmídios podem ainda ser classificadas como enzimas de espectro convencional (como TEM-1 e SHV-1) e enzimas de espectro estendido. As enzimas de espectro convencional não conferem resistência às cefalosporinas. Já as enzimas de espectro estendido, conferem resistência às cefalosporinas, mesmo às mais recentes e também ao aztreonam e aos oximinos beta-lactâmicos relacionados (Jacoby e Medeiros, 1991; Bradford *et al.*, 1994; Payne *et al.*, 1994; Jacoby e Han, 1996; Emery e Weymouth, 1997; Rasheed *et al.*, 2000). As ESBLs são geralmente codificadas por genes TEM e SHV mutados, e os genes mutados geralmente estão localizados em plasmídios e por isso, são facilmente transferidos a outros microrganismos (Emery e Weymouth, 1997). As mutações envolvem a substituição de um ou mais aminoácidos da enzima, o que, por sua vez, altera a sua configuração ou altera a sua propriedade de ligação ao sítio ativo, ampliando o seu espectro hidrolítico (Rasheed *et al.*, 2000). Um outro tipo de resistência do tipo transmissível, aos oximino beta-lactâmicos, surge pela aquisição de plasmídio contendo genes AmpC (normalmente de origem cromossômica). A beta-lactamase assim produzida fornece resistência às cefamicinas, como a cefoxitina (Jacoby e Han, 1996).

A resistência à cefoxitina é considerada um marcador tanto para a perda de porina, como para a presença de enzimas do tipo AmpC (Steward *et al.*, 2001). O teste de suscetibilidade utilizando cefamicinas (cefoxitina) pode ajudar na distinção destes dois tipos de produção de beta-lactamases, considerando que AmpC beta-lactamases conferem resistência às cefamicinas, mas não o fazem as ESBLs (Morris *et al.*, 2003).

Nas bactérias produtoras de beta-lactamases o nível de resistência a antibióticos pode ser afetado por vários fatores diferentes, incluindo a afinidade da enzima ao antibiótico, a quantidade da beta-lactamase produzida e a facilidade com que o antibiótico

ganha acesso ao espaço periplásmico (Rice *et al.*, 2000). Considerando este último fator, merece destaque o papel exercido pelas **porinas**, importantes na permeabilidade dos agentes antimicrobianos, na permeabilidade de substratos, como ferro e nas interações com os mecanismos de defesa do hospedeiro, como a ativação do sistema complemento (Hernández-Allés *et al.*, 1999; Kurupati *et al.* 2006). *K. pneumoniae* produz principalmente duas porinas importantes quanto ao fenótipo de resistência a antibióticos: OmpK35 e OmpK36 (Hernández-Allés *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001; Doménech-Sánchez *et al.*, 2003). Recentemente, a quiescente OmpK37 e OmpK45 foram também reconhecidas como possíveis porinas implicadas na resistência a antibióticos beta-lactâmicos. A modificação nas proteínas de membrana externa (Omp) OmpK35 (homóloga à OmpF de *E. coli*) e OmpK36 (homóloga à OmpC de *E. coli*), combinada com a produção de ESBLs têm sido associadas com elevação dos valores de CIMs para cefalosporinas e quinolonas (Wu *et al.*, 2001). A maioria das cepas clínicas de *K. pneumoniae* não produtoras de ESBLs expressa tanto a OmpK35 e OmpK36, ao passo que a maioria das cepas produtoras de ESBLs produz somente OmpK36. Os raros exemplares desprovidos de OmpK35 e OmpK36 eram produtores de ESBLs (Doménech-Sánchez *et al.*, 2003). Demonstra-se que a perda de porinas em cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs causa elevação da resistência às cefalosporinas de terceira geração, monobactamas e redução da sensibilidade às fluoroquinolonas (Hernández-Allés *et al.*, 1999). A perda de OmpK36 está relacionada à resistência à cefoxitina e à elevada resistência às cefalosporinas (em cepas produtoras de ESBLs) e à resistência aos carbapenêmicos (em cepas produtoras de beta-lactamases do tipo AmpC mediadas por plasmídios). Ainda, a perda de OmpK36 resulta em aumento moderado da resistência às fluoroquinolonas, em cepas com topoisomerases alteradas e/ou com efluxo de quinolonas (Doménech-Sánchez *et al.*, 2003). De forma a investigar o possível papel da OmpK35 na resistência, Doménech-Sánchez e cols., (2003) realizaram estudos clonando o gene *ompK35*. A expressão de OmpK35 em cepa de *K. pneumoniae* CSUB10R (cepa desprovida de OmpK35 e OmpK36) diminuiu as CIMs das cefalosporinas e meropenem mais de 128 vezes e diminuiu as CIMs de imipenem, ciprofloxacina e cloranfenicol mais de 8 vezes. As reduções das CIMs pela OmpK35 foram 4 vezes (cefepime), 8 vezes (cefotetan, cefotaxima e cefpirona) ou 128 vezes (ceftazidima) maiores do que aquelas causadas pela OmpK36, mas as CIMs foram similares ou 1 diluição mais

baixa para outros agentes avaliados. Dados de Hernández-Allés e cols., (1999) revelam uma forte correlação entre a expressão das duas porinas e fenótipo não-produtor de ESBLs ou expressão de somente uma porina (OmpK36) e fenótipo produtor de ESBLs. É possível que cepas produtoras de ESBLs respondam à pressão de antibióticos suprimindo porinas ou aumentando a expressão de ESBLs, ou ambas situações, com a subsequente diminuição da captação de antibióticos ou aumento da degradação do antibiótico. No entanto, Wu e cols., (2001) sugerem que a perda de OmpK35 não está relacionada com a resistência às cefalosporinas de terceira geração. Os autores concluem que a perda de OmpK35 combinada com beta-lactamases SHV-1 e TEM-1 causaram a falsa designação de cepa produtora de ESBLs para 9 cepas de *K. pneumoniae* isoladas de 9 pacientes pediátricos.

OmpF (homóloga à OmpK35) apresenta-se como um canal mais alargado do que OmpC (homóloga à OmpK36), teoricamente permitindo a passagem de moléculas maiores pela membrana externa. A perda de OmpF deveria presumivelmente desempenhar um papel mais importante na resistência do que a perda de OmpC. No entanto, um isolado clínico altamente resistente a antibióticos, apresentando perda de OmpC, mas apresentando OmpF já foi isolado de um paciente durante a terapia com cefalexina. Experimentos subsequentes *in vitro* mostraram que a síntese de OmpF estava fortemente reprimida durante o crescimento em meio de alta osmolaridade, uma repressão que simularia aquela vista nos tecidos humanos e em fluidos biológicos. Os autores concluíram que pelo fato da OmpF estar fortemente reprimida pela elevada osmolaridade, a expressão predominante da porina OmpC deveria desempenhar um papel importante na permeabilidade da droga. Esta observação está de acordo com um estudo demonstrando que alteração das Omps, especialmente a perda de OmpK35 quando OmpK36 está presente, pode resultar em aumento na CIM de cefotaxima. A perda da porina OmpK36, combinada com a produção de beta-lactamases do tipo AmpC são também descritas como causa das elevadas CIMs de agentes carbapenêmicos (Wu *et al.*, 2001).

Atualmente, mais de 150 tipos variantes de ESBLs são reconhecidos (Pai *et al.*, 1999; Bonfiglio *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Mendelson *et al.*, 2005; Schmitt, Jacobs e Schmidt, 2007). Quase todas as ESBLs pertencem a uma das quatro famílias: TEM, SHV, CTX-M e OXA (para cepas de *P. aeruginosa*). A maioria pertence às famílias TEM e SHV (Mendelson *et al.*, 2005). Com exceção das enzimas da família OXA, todas as demais

pertencem à classe A de Ambler ou ao grupo 2be, de Bush. As enzimas do tipo OXA pertencem à classe D ou ao grupo 2d. Enquanto que as ESBLs do tipo TEM e SHV desenvolveram-se de seus ancestrais SHV-1 e TEM-1/TEM-2, como resultado de mutações pontuais, a origem das outras enzimas está menos clara. Algumas enzimas do tipo CTX-M são idênticas ou similares às beta-lactamases espécie-específicas observadas em *Kluyvera* spp (Schmitt, Jacobs e Schmidt, 2007). Beta-lactamases do tipo CTX-M constituem um grupo de beta-lactamases de espectro estendido cuja frequência nos chama atenção pela rápida ascensão (Edelstein *et al.*, 2003) sendo frequentemente relatadas principalmente em hospitais da Polônia (Tzelepi *et al.*, 2003), predominando também em partes orientais da Europa, América do Sul e Japão (Liebana *et al.*, 2006). Atualmente a família CTX-M inclui mais de 20 beta-lactamases, agrupadas com base na similaridade da sequência de aminoácidos em quatro subtipos mais comumente encontrados: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (Edelstein *et al.*, 2003). Apresentam menos de 40% de homologia com enzimas do tipo TEM e SHV. Como um grupo, beta-lactamases do tipo CTX-M são as mais próximas em identidade (sequência de aminoácidos) às cefalosporinases cromossômicas de *Kluyvera georgiana*, *Kluyvera cryorescens* e principalmente *Kluyvera ascorbata*, e apresentam associação com estruturas genéticas potencialmente móveis, o que provavelmente contribuiu para a história epidemiológica das suas disseminações (Paterson *et al.*, 2003; Tzelepi *et al.*, 2003). A maioria das beta-lactamases do tipo CTX-M é cerca de 4 a 16 vezes mais ativa sobre cefotaxima do que ceftazidima, porém, subtipos com expressiva atividade enzimática para ceftazidima foram recentemente detectadas, recebendo as denominações de CTX-M-15, -16, -19 e -27. A literatura revela, ainda, a existência de enzimas CTX-M muito mais ativas contra aztreonam e ceftriaxona do que ceftazidima (Bell *et al.*, 2002; Edelstein *et al.*, 2003). Desta forma, o clássico fenótipo de resistência conferido pelas beta-lactamases CTX-M não é universal entre todos os microrganismos produtores de CTX-M, considerando que diversos fatores, incluindo a produção de beta-lactamases adicionais, ou mutações alterando a especificidade das enzimas CTX-M aos substratos, podem mascarar sua presença (Edelstein *et al.*, 2003). Assim, os laboratórios clínicos que utilizam ceftazidima como droga marcadora para a produção de ESBLs, provavelmente subestimarão os microrganismos produtores de ESBLs do tipo CTX-M (Paterson *et al.*, 2003). Tornam-se importantes os estudos epidemiológicos

que visam à avaliação do melhor substrato e o tipo de ESBLs mais prevalente na instituição, na região ou no país.

A Tabela 2 ilustra a distribuição geográfica das ESBLs mais dispersas entre os isolados clínicos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Sanders e Sanders, 1992).

Inicialmente, as ESBLs foram identificadas em isolados bacterianos na Europa ocidental, onde importantes surtos causados por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, apresentando resistência à ceftazidima, foram descritos, particularmente envolvendo *K. pneumoniae* (Bradford *et al.*, 1994). Atualmente, *K. pneumoniae* é expressivamente a espécie na qual as ESBLs são mais detectadas, correspondendo a 70% das cepas produtoras de ESBLs (Sirot, 1995). Jacoby e Medeiros (1991) também destacam *K. pneumoniae* como a espécie bacteriana na qual mais comumente são isoladas as ESBLs. A causa para tal constatação ainda é desconhecida. Provavelmente, isso se deva ao fato de *K. pneumoniae* constituir parte da microbiota normal conseguindo sobreviver por períodos mais longos sobre a pele e sobre vetores inanimados e também por adquirir facilmente plasmídios conjugativos (Hernández *et al.*, 2003). Sabe-se que o nível de resistência produzida por uma ESBL isolada de *K. pneumoniae* não é notavelmente maior do que aquele observado nas ESBLs isoladas de *E. coli* ou de outras bactérias gram-negativas. A capacidade de transmitir informações genéticas contidas em plasmídios responsáveis pela expressão de ESBLs permite que a resistência se dissemine prontamente a outros patógenos (Sirot, 1995). Apesar das ESBLs serem mais comumente detectadas em cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli*, tais enzimas podem ser isoladas de outras enterobactérias (Jacoby e Medeiros, 1991; Sanders e Sanders, 1992; Sirot, 1995; Emery e Weymouth, 1997; Rasheed *et al.*, 2000), sendo frequentemente associadas a surtos nosocomiais (Jacoby e Medeiros, 1991; Rasheed *et al.*, 2000). Como cepas produtoras de ESBLs frequentemente emergem na forma de surtos focais, suas prevalências podem variar consideravelmente de um local para outro e mesmo temporalmente dentro de um dado lugar (Pfaller e Segreti, 2006). Pesquisas realizadas em hospitais envolvendo cepas de *K. pneumoniae* na França, Inglaterra e Portugal indicam que 14 a 16% produzem ESBLs, enquanto uma baixa frequência (< 0,1%) é observada em *E. coli* (Sirot, 1995).

Os plasmídios normalmente envolvidos na expressão das ESBLs, medeiam a resistência a outros antibióticos como aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas. Desta forma, o aparecimento de padrões não usuais de resistência pode servir de alerta para a possibilidade da presença de um patógeno bacteriano produtor de ESBLs, o que, por sua vez deve render estudos adicionais da cepa e dos pacientes em questão (Katsanis *et al.*, 1994; Winokur *et al.*, 2001; Tonkic, Goic-Barisic e Punda-Polic, 2005; Koneman *et al.*, 2006). Medidas simples de higiene, como as boas práticas de lavagem das mãos, o uso de equipamentos estéreis (particularmente para o acesso intravenoso) e o agrupamento de pacientes, apresentando infecções similares, em uma mesma localização, podem ajudar a prevenir outras disseminações deste tipo de resistência (Blomberg *et al.*, 2005), tornando de muita importância as ações dos núcleos de vigilância.

A era moderna do controle da infecção hospitalar começou na década de 50, quando ocorreram importantes epidemias da doença estafilocócica nos hospitais da Europa e dos Estados Unidos. As investigações iniciais da epidemia foram conduzidas pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC). A persistência das epidemias estafilocócicas nos hospitais, durante a década de 60, resultou numa abordagem mais organizada para o controle da infecção hospitalar (Henry, 1995), definidas como infecções adquiridas no decorrer ou em consequência da hospitalização, que não estavam presentes no momento da internação (Harrison, 1998). Os surtos nosocomiais acometem pacientes de várias especialidades médicas. Apesar dos fungos, vírus e outros agentes microbiológicos causarem infecções nosocomiais, os agentes bacterianos constituem a causa mais comumente reconhecida de surtos (Tenover, Arbeit e Goering, 1997).

Em 1999, o NCCLS (atualmente CLSI) sugeria uma nova estratégia de teste e de relato para a identificação de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* produtores de ESBLs (Wu *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2002). Em 2005, houve, então a inclusão de *Proteus mirabilis* ao grupo de bactérias para as quais atenção especial deveria ser dada, principalmente diante de valores dos halos de inibição reduzidos para certas cefalosporinas de espectro estendido ou para o aztreonam, merecendo a realização de testes de triagem e confirmação quando obtido de pacientes em situações clínicas relevantes.

**Tabela 2:** Distribuição geográfica das ESBLs mais dispersas entre os isolados clínicos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Enzima	Localização e ano do isolamento ou do relato
SHV-2	Alemanha, 1983; Tunísia, 1984; Chile, 1988; Grécia, 1988; China, 1988; Senegal, 1989; Argentina, 1989; França, 1989; Austrália, 1990; Inglaterra, 1990; Estados Unidos, 1991; Egito, 1991; Suíça, 1991
SHV-5	Chile, 1989; Austrália, 1990; Inglaterra, 1990; Grécia, 1990; Argentina, 1991
TEM-6	Alemanha, 1987; Espanha, 1990; Singapura, 1990; Portugal, 1991
TEM-3	França, 1984; Caribe, 1989; Tunísia, 1990
TEM-10	Inglaterra, 1989; Estados Unidos, 1989; Canadá, 1990
SHV-4	França, 1989; Estados Unidos, 1990

SANDERS e SANDERS, 1992.

#### 1.4. Aspectos Epidemiológicos da Colonização e Infecção por *K. pneumoniae*

Os bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* constituem os representantes bacterianos mais frequentemente isolados em espécimens clínicos. Estão amplamente dispersos na natureza, sendo encontrados no solo, na água, em plantas e, como indica o nome da família, no trato intestinal de humanos e animais. As enterobactérias compreendem bacilos aeróbios e anaeróbios facultativos não formadores de esporos, com flagelo peritríquio ou sem motilidade, oxidase-negativos, gram-negativos, que produzem ácido pela fermentação da glicose e reduzem nitrato a nitrito (Henry, 1995).

O nome *Klebsiella*, conferido para designar o gênero bacteriano pertencente à família *Enterobacteriaceae*, se deve a Edwin Klebs, um microbiologista alemão do final do século XIX. O bacilo gram-negativo atualmente conhecido como *Klebsiella* foi também descrito por Carl Friedlander e por muitos anos o “bacilo de Friedlander” foi bem conhecido como um dos causadores da pneumonia severa, frequentemente fatal. *Klebsiella pneumoniae* é a espécie-tipo deste gênero. Antes do advento dos antibióticos, da quimioterapia e dos procedimentos imunossupressores, as doenças infecciosas causadas pelas enterobactérias eram relativamente bem definidas; casos clássicos de pneumonia, caracterizados pela produção de escarro vermelho-tijolo tinham como agente causador “o bacilo de Friedlander” (Koneman *et al.*, 2006).

O gênero *Klebsiella* possui dois habitats, sendo um, o ambiente, onde são encontrados em águas, esgotos, solos e sobre plantas e o outro, as superfícies mucóides de mamíferos, como os seres humanos, cavalos ou suínos (Podschung e Ullmann, 1998).

Prado e cols., (2002), estudando os microrganismos isolados de 103 baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital público de Goiânia, nos períodos matutino e diurno, entre os meses de outubro de 1999 e setembro de 2001, identificaram uma prevalência de 56% de enterobactérias (15 gêneros de enterobactérias), das quais *K. pneumoniae*, representou a espécie mais frequente (17%), e uma prevalência de 18% de *Staphylococcus* coagulase-negativos.

As espécies do gênero *Klebsiella* encontram-se amplamente distribuídas na natureza e no trato gastrointestinal de humanos e animais, apresentam-se como colônias grandes, frequentemente de consistência mucóide e de pigmento vermelho em ágar MacConkey (indicativo de fermentação da lactose e produção de ácido). Nem todas as cepas, no entanto, são mucóides podendo ocorrer semelhanças com algumas espécies de *Enterobacter*. Sítios anatômicos comuns de colonização por espécies do gênero *Klebsiella* são os olhos, o trato respiratório e principalmente o trato gastrointestinal, sendo este considerado o reservatório mais comum. A transmissão do microrganismo de paciente a paciente é facilitada pelas mãos dos profissionais da saúde que podem atuar como carreadores transitórios ou persistentes (Gupta *et al.*, 2004). Estima-se que *Klebsiella* spp seja responsável por 8% de todas as infecções bacterianas nosocomiais nos Estados Unidos e Europa. Nos Estados Unidos, em particular, *Klebsiella* representa de 3% a 7% das infecções bacterianas nosocomiais, posicionando o gênero dentre os 8 patógenos infecciosos mais importantes (Podsung e Ullmann, 1998).

*Klebsiella pneumoniae* é a bactéria isolada com maior frequência de espécimens clínicos e pode causar uma forma clássica de pneumonia primária. Não é frequentemente encontrada na orofaringe de pessoas normais (1% a 6% são portadores); porém uma prevalência superior a 20% pode ocorrer em pacientes hospitalizados. Esta colonização pode ser atribuída às infecções pulmonares que geralmente ocorrem em pacientes com condições debilitantes como alcoolismo, diabetes mellitus e doença pulmonar obstrutiva crônica. *Klebsiella pneumoniae* pode causar também uma variedade de infecções extra-pulmonares, incluindo enterite e meningite, em recém-nascidos; infecções do trato urinário, em crianças e adultos, e ainda septicemia e infecções associadas a acessos venosos centrais (Koneman *et al.*, 2006; Paterson *et al.*, 2003). As taxas de portadores, em pacientes hospitalizados, obtidas na literatura, são de 77% para amostras fecais, 19% para as amostras

de faringe e 42% para as amostras obtidas das mãos dos pacientes (Podschung e Ullmann, 1998).

A maior incidência das infecções causadas pelas espécies do gênero *Klebsiella* durante a década passada provavelmente reflete tanto um aumento das infecções nosocomiais em pacientes debilitados ou imunossuprimidos como uma maior propensão à resistência antimicrobiana (Koneman *et al.*, 2006). Esta bactéria constitui causa de infecções importantes, sejam comunitárias ou nosocomiais. As infecções de corrente sanguínea envolvendo *K. pneumoniae* acometem os pulmões (pneumonia comunitária e associada à ventilação mecânica), o trato geniturinário, tecidos intra-abdominais, sendo responsáveis ainda por infecções relacionadas a acessos venosos centrais (Paterson *et al.*, 2003). Como causa de bacteremia nosocomial atribuída aos bacilos Gram-negativos, o gênero *Klebsiella* é superado apenas por *Escherichia coli*. Em enfermarias pediátricas, as infecções nosocomiais por *Klebsiella* são especialmente problemáticas, particularmente em crianças prematuras e hospitalizadas em unidades de terapia intensiva (Podschung e Ullmann, 1998).

Na França a prevalência de cepas produtoras de ESBLs está aumentando, tendo sido observadas as seguintes frequências para os anos de 1985, 1987 e 1988: 0,75%, 8,80% e 11%, respectivamente. Surtos nosocomiais causados por cepas produtoras de ESBLs foram relatados em Paris, Cambridge (Massachusetts) e Providence (Jacoby e Medeiros, 1991). Surtos institucionais podem refletir a ubiquidade das enterobactérias, a pressão seletiva causada pelo uso intenso das cefalosporinas de espectro estendido e as falhas no estabelecimento de medidas efetivas de controle de infecção (Thomson e Sanders, 1992).

Jarlier e cols., (1988) em seus estudos realizados entre novembro de 1985 a abril de 1987 no Hospital Universitário Pitié-Salpêtrière (Paris), relatam que cepas produtoras de ESBLs foram mais frequentemente isoladas de urina (60%) e de sangue (18%). A espécie bacteriana produtora de ESBLs isolada mais frequentemente foi *K. pneumoniae*, e dentre as enterobactérias as cepas produtoras de ESBLs representaram menos de 1%, em 1985, 11% em 1986 e 35% de janeiro a abril de 1987. As cepas foram isoladas na primeira semana de hospitalização em 17% dos casos; na segunda semana, a porcentagem de isolamento foi de 36%, e de 47% nas semanas seguintes.

No entanto, o trabalho de Chanal e cols., (1996) mostra que durante os seis primeiros meses de 1990 e 1994, respectivamente, 3179 e 2721 cepas não repetidas de enterobactérias foram isoladas no Hospital Escola de Clermont-Ferrand (França), sendo a prevalência global das cepas produtoras de ESBLs similar nos dois períodos de estudo: 2,3%, em 1990 e 2,7%, em 1994. A prevalência das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs, por sua vez, apresentou também leve aumento durante o período estudado (16,9% - 22,9%).

De acordo com os dados de Emery e Weymouth, (1997), aproximadamente 1,5% das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* isoladas de 1,2% (23 de 1844) dos pacientes atendidos em um hospital americano, num período de 6 meses, produziam ESBLs. A espécie bacteriana mais comum foi *K. pneumoniae* detectada em 52% (12 de 23) dos pacientes. Ainda, dentre os pacientes, dos quais foram isoladas cepas de *K. pneumoniae*, 12 foram acometidos por cepa de *K. pneumoniae* produtora de ESBLs, obtendo-se uma prevalência mínima dentro da espécie de 3,5%. Uma prevalência similarmente baixa de 1,5% (129 de 9382) dentre enterobactérias estudadas foi relatada por Sirot e cols., num estudo envolvendo hospitais franceses em 1990.

Coudron e cols., (1997), num período de estudo de 20 semanas, relataram que 9,2% de todas as enterobactérias avaliadas eram produtoras de ESBLs. Considerando *K. pneumoniae*, 19% dos isolados eram produtores de ESBLs. Os autores encontraram 9 espécies de enterobactérias produtoras de ESBLs, e destacaram que a porcentagem de cepas detectadas pelo método do sinergismo por disco-duplo foi a seguinte: aztreonam, 95%; ceftazidima, 79%; ceftriaxona, 88% e cefpodoxima, 90%.

No Brasil, a frequência de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs é mais expressiva do que os índices observados em muitos hospitais europeus e americanos, sendo responsável por 45% das cepas de *K. pneumoniae* (Marra *et al.*, 2006b).

Até 1987, não havia relatos de bactérias produtoras de ESBLs provenientes do cone sul da América do Sul. Em 1997 o programa SENTRY (um dos mais abrangentes programas de vigilância da resistência antimicrobiana em várias áreas do mundo) analisou cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs isoladas de corrente sanguínea, encontrando dados que variavam de 4,5% (Uruguai) a 12% (Chile e México) para *E. coli* e de 31% (México) a 56,6% (Brasil) para *K. pneumoniae*. Em 1998, dados do programa

SENTRY como parte de um estudo multicêntrico brasileiro, contando com 20 laboratórios clínicos e 36 hospitais localizados em diferentes regiões do país, revelaram que dos 855 isolados estudados, 591 compreendiam enterobactérias e destas, os dois patógenos mais frequentemente isolados eram *E. coli* e *K. pneumoniae*. De acordo com os dados, 13,6% de *E. coli* e 42,1% de *K. pneumoniae* eram produtores de ESBLs (Motta *et al.*, 2003). Sader e cols., (2001) participando do programa SENTRY analisaram a ordem de ocorrência de patógenos, provenientes de 12 hospitais de quatro estados brasileiros, causadores de infecção em corrente sanguínea, do trato respiratório inferior, de ferida, pele, tecidos moles e do trato urinário em pacientes hospitalizados, entre janeiro de 1997 e dezembro de 1999. Foram estudadas 3728 amostras bacterianas das quais houve a constatação da produção de ESBLs em *K. pneumoniae* em 48,4%, sendo o microrganismo em questão o agente causador mais comum de bacteremia, de pneumonia, de infecção do trato urinário e por fim de infecção em ferida. Piperacilina-tazobactam mostrou maior atividade *in vitro* do que ticarcilina-ácido clavulânico, porém, considerando as cepas de *K. pneumoniae*, somente 39,4% (CIM<sub>90</sub>>64 mg/mL) foram suscetíveis àquela combinação. Ainda, Sader e cols., (1998) obtiveram baixa suscetibilidade de cepas de *K. pneumoniae* à piperacilina-tazobactam (79%), indicando uma elevada percentagem de possíveis cepas produtoras de ESBLs. Fluoroquinolonas foram muito ativas contra cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs (>90% de suscetibilidade), mas não contra cepas de *E. coli* (70,2%-74,5% de suscetibilidade).

No trabalho de Oplustil e cols., (2000) os autores estudaram amostras obtidas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, envolvidos no programa de vigilância RESISTNET (cujo objetivo é o monitoramento da resistência bacteriana a vários agentes antimicrobianos, iniciado em 1998 entre os países da América Latina). Entre abril de 1998 a abril de 1999, 1407 enterobactérias foram estudadas, sendo *K. pneumoniae* um dos principais patógenos. De forma geral, do total de 386 cepas de *K. pneumoniae*, a percentagem de cepas possivelmente produtoras de ESBLs foi de 36,3%, sendo a maioria isolada de cateteres (58,8%), de sangue (47,2%) e de urina (24,4%). Das 123 cepas isoladas de urina 41 (33%) eram de pacientes não hospitalizados consistindo em 17,1% a percentagem de prováveis produtoras de ESBLs.

Tabela 3. Frequência de ocorrência de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL no Brasil.

Hospital	Período da coleta	No. de isolados clínicos; No. de <i>Klebsiella</i> spp isolado; (Porcentagem)	No. de cepas de <i>Klebsiella</i> spp produtoras de ESBLs (%)	Publicação (ano)	Autores
Hospital Universitário Complexo Irmandade Santa Casa de Misericórdia – Porto Alegre	Jun1999-Dez1999	107 47 <i>K. pneumoniae</i> (43,9%)	75%* 65,9%**	2004	Azevedo, P. A., <i>et al.</i>
Centro diabético – Ceará	Mar2000-Nov2001	156 33 <i>K. pneumoniae</i> (21,2%)	30,3% ( 10/33)	2003	Motta, R. N., <i>et al.</i>
Centros médicos latino-americanos [Brasil: São Paulo, Rio de Janeiro, Florianópolis, Porto Alegre] (Programa SENTRY)	1997-2000	1961 227 <i>Klebsiella</i> spp (11,6%)	28,9%-45,9%	2002	Gales, A. C., <i>et al(a).</i>
Centros médicos latino-americanos [Brasil: São Paulo, Rio de Janeiro, Florianópolis, Porto Alegre] (Programa SENTRY)	1997-2000	2502 <sup>b</sup> 255 <sup>b</sup> <i>K. pneumoniae</i> (10,2%)	96 (37,6%)	2002	Gales, A. C. <i>et al(b).</i>
Brasil: Rio de Janeiro, Florianópolis, São Paulo, Porto Alegre (Programa SENTRY)	Jan1997 – Dez1999	3728 318 <i>K. pneumoniae</i> (8,5%)	50,3% (160/318)	2001	Sader, H. S., <i>et al.</i>
São Paulo, Brasília, Curitiba, Salvador, Fortaleza, Porto Alegre (Programa RESISTNET)	Abr1998-Abr1999	1407 386 <i>K. pneumoniae</i> (27,4%)	36,3% (geral); Corrente sanguínea: 47,2%; Cateter: 58,8%; Urina: 24,4%	2000	Oplustil, C. P., <i>et al.</i>
Brasil: Rio de Janeiro, Florianópolis, São Paulo (Programa SENTRY)	Jan1997-Jan1998	1102 109 <i>Klebsiella</i> spp (9,9%)	Corrente sanguínea: 56,6% Pneumonia: 30% Ferida, pele ou tecidos moles: 60% Urina: 40%	1999	Sader, H. S., <i>et al(a).</i>
Centros médicos latino-americanos [ Brasil: São Paulo, Rio de Janeiro,	Os primeiros seis meses de 1997	736 <sup>a</sup> 46 <i>Klebsiella</i> spp <sup>a</sup> (6,3%)	56,5% (26/46)	1999	Sader, H. S., <i>et al(b).</i>

Florianópolis]  
(Programa  
SENTRY)

---

\* , usando método do efeito de inibição do ácido clavulânico;

\*\* , usando E-test®;

<sup>a</sup> microorganismos isolados de infecções em corrente sanguínea;

<sup>b</sup> microorganismos isolados de amostras do trato respiratório;

Tabela 4. Frequência de ocorrência de cepas de *Klebsiella pneumoniae* em vários países.

País	Período de estudo	No. de isolados clínicos; No. de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolado; (Porcentagem)	No. de cepas de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL (%)	Ano da publicação	Referência
Ásia (região do Pacífico; 17 centros médicos) SENTRY*	1998-2002	[6388 enterobactérias]; 1738 <i>K. pneumoniae</i> ; (27,21%)		2005	Hirakata, Y. <i>et al.</i>
Cingapura		225 (3,52%)	80 (35,60%)		
China		75 (1,17%)	23 (30,70%)		
África do Sul		135 (2,11%)	38 (28,10%)		
Filipinas		319 (4,99%)	70 (21,90%)		
Japão		210 (3,29%)	21 (10,0%)		
Austrália		328 (5,13%)	12 (3,70%)		
Hong-Kong		224 (3,51%)	26 (11,60%)		
Taiwan		222 (3,48%)	30 (13,50%)		
Estudo PEARL (38 centros): países europeus, do oriente médio e África do Sul	Fev2001- Dez2002	7143 2206 (30,88%)	401/2206 (18,2%)	2004	Bouchillon, S. K. <i>et al.</i>
SENTRY*	Jan1997- Dez2000	7207 <sup>a</sup> 664 <sup>a</sup> (9,21%)	314/664 (47,28%)	2003	Sader, H. S. <i>et al.</i>
Brasil		238 (35,84%)	118/ 238 (49,57%)		
Argentina		172 (25,90%)	79/172 (45,93%)		
Chile		117 (17,62%)	54/117 (46,15%)		
Colômbia		69 (10,39%)	27/69 (39,13%)		
México		48 (7,23%)	23/48 (47,91%)		
Venezuela		15 (2,26%)	4/15 (26,67%)		
SENTRY*	1997-1998	70872 4668 (6,6%)		2001	Winokur, P. L. <i>et al.</i>
EUA		-	7,6 %		
Canadá		-	4,9 %		
América Latina		-	45,4 %		
Região do Pacífico Ocidental		-	24,6 %		
Europa		-	22,6 %		
SENTRY*	Jan1998- Dez1999	2193 678 (30,92%)	146/678 (21,53%)	2002	Bell, J. M. <i>et al.</i>
Austrália		-	7/119 (5,9%)		
China		-	23/75 (30,7%)		
Japão		-	13/106 (12,3%)		
Taiwan		-	6/47 (12,8%)		
Filipinas		-	45/143 (31,5%)		
Cingapura		-	27/65 (41,5%)		
África do Sul		-	13/36 (36,1%)		
Hong-Kong		-	12/87 (13,8%)		
SENTRY*	1997-2000	2502 <sup>b</sup> 255 <sup>b</sup> (10,19%)	112/255 (43,92%)	2002	Gales, A. C. <i>et al</i> (b).
Argentina		75 (29,41%)	34/75 (45,33%)		
Brasil		96 (37,65%)	52/96 (54,17%)		
Chile		23 (9,02%)	9/23 (39,13%)		
Colômbia		29 (11,37%)	10/29 (34,48%)		
México		9 (3,52%)	1/9 (11,11%)		
Uruguai		4 (1,57%)	1/4 (25,00%)		
Venezuela		25 (9,80%)	5/25 (20,00%)		
América do Norte					
EUA (Connecticut: grande hospital-escola comunitário)	2001-2002	392	9,6% <i>Klebsiella</i> spp	2004	Dandekar, P. K. <i>et al.</i>
EUA	Jan1996- Dez1997	455 <sup>a</sup> 58 (12,75%)	11/58 (18,97%)	2003	Paterson, D. L. <i>et al.</i>
EUA e Europa	NI	75 31 (41,33%)	18/31 (58,06%)	1998	Moland, E. S. <i>et al.</i>
América do Sul					
Colômbia (8 hospitais terciários)	Jan2002- Jul2002	1468 394 (26,83%)	77/394 (19,54%)	2004	Villegas, M. V. <i>et al.</i>

Argentina (Buenos Aires: 17 hospitais públicos)	Abr2000-Mai2000	427 29* (6,79%) - *correspondente a um período de 1 semana	(25,64%)	2003	Quinteros, M. <i>et al.</i>
Argentina (SENTRY*)	Jan1996-Dez1997	455 <sup>a</sup> 41 (9,01%)	18/41 (43,90%)	2003	Paterson, D. L. <i>et al.</i>
<b>Europa</b>					
República Tcheca (16 hospitais tchecos)	Set2004	483 <i>K. pneumoniae</i>	117 (24,2%)	2006	Kolar, M. <i>et al.</i>
Espanha (Barcelona)	NI	5251 enterobactérias 361 <i>K. pneumoniae</i> (6,67%)	4 (1,11%)	2005	Miró, E. <i>et al.</i>
Sul da Croácia – (hospital universitário em Split)	Jan2001-Dez2002	6169 715 (11,6%)	263/715 (36,8%)	2005	Tonkic, M. <i>et al.</i>
Espanha (Barcelona)	1994-1998	7801 581 (7,45%)	1/581 (0,17%)	2002	Sabaté, M. <i>et al.</i>
	1997-1999	9109 (5,39%)	8/491 (1,6%)		
Espanha (40 hospitais)	Mar2000-Jun2000	352 81(23,01%)	70/81 (86,42%)	2003	Hernández, J. R. <i>et al.</i>
Europa Ocidental e Austral	Mai1997-Out1998	433 <i>Klebsiella spp</i> 342 <i>K. pneumoniae</i> (78,98%)	94/342 (27,49%)	2000	Babini, G. S.; Livermore, D. M.
Europa – SENTRY* - 25 hospitais europeus participantes	1997-1999	17 934 767(4,3%)	141/767 (18,1%)	2004	Nijssen, S. <i>et al.</i>
França (8 laboratórios particulares da região de Aquitaine)	1999 (5 meses)	2599 39(1,5%)	8/39 (21%)	2003	Arpin, C. <i>et al.</i>
França (hospital de Besançon)	Jan2000-Dez2001	7673 623 (8,12%)	8/623 (1,3%)	2003	Bertrand, X. <i>et al.</i>
França (14 laboratórios hospitalares)	1996-1998	7325 434 (5,92%)	60/434 (13,82%)	2002	Sirof, J. <i>et al.</i>
Irlanda (6 hospitais)	Set1996-Set1999	925 70 (0,76%)	7/70 (10,00%)	2003	Morris, D. <i>et al.</i>
Grécia (2 hospitais)	Ago2001-Out2001	203 79 (38,92%)	46/79 (58,23%)	2003	Tzelepi, E. <i>et al.</i>
Itália (10 laboratórios hospitalares)	Jan1999-Jun1999	8015 946 (11,80%)	194/946 (20,5%)	2002	Bonfiglio, G. <i>et al.</i>
Itália (10 laboratórios de microbiologia)	Jan1999-Jun1999	8015 946 (11,80%)	189/946 (20,0%)	2002	Spanu, T. <i>et al.</i>
Países Baixos	1 semana (8 universidades e 3 grandes laboratórios regionais)	767 116 (15,12%)	7/116 (6,03%)	1999	Stobberingh, E. E. <i>et al.</i>
<b>Ásia</b>					
Coréia (3 hospitais universitários)	Jun2003-Nov2003	443 158 (35,67%)	28/158 (17,72%)	2005	Kim, J. <i>et al.</i>
Coréia (13 hospitais em 6 regiões diferentes)	Abr2002-Jun2002	9219 2652 (28,77%)	78/260*(30%) *isolados selecionados aleatoriamente	2004	Jeong, S. H. <i>et al.</i> (b).
Coréia	NI	53	39/53 (73,58%)	1998	Kim, J. <i>et al.</i>
Bangladesh (hospital urbano em Dhaka City)	10 meses	157 76 (48,40%)	30/76(39,5%)	2004	Rahman, M. M. <i>et al.</i>
Rússia (28 hospitais)	1997-1998	904 410 (45,35%)	248/410 (60,5%)	2003	Edelstein, M. <i>et al.</i>
Líbano (hospital universitário geral)	Jan1997-Dez2001	4299 1248 (29,03%)	244/1248 (20%)	2003	Daoud, Z.; Hakime, N.
Japão (7 laboratórios da região de Kinki)	2 meses (1998 e 2000)	800 200 (25%)	5/200 (2,5%)	2003	Yamasaki, K. <i>et al.</i>
China (hospital Huashan)	Jan1999-Dez1999	986 559 (56,69%)	285/559 (51%)	2002	Xiong, Z. <i>et al.</i>
Tailândia (Bangkok)	Jun1999-Ago1999	374 62 (16,58%)	36/62 (58,0%)	2001	Girlich, D. <i>et al.</i>
Taiwan	Jan1996-Dez1997	455 <sup>a</sup> 142 (31,21%)	3/142 (2,11%)	2003	Paterson, D. L. <i>et al.</i>
Taiwan (Sul)	Abr-Set1998	234	20/234 (8,5%)	2000	Yan, J. J. <i>et al.</i>
Taiwan (hospital distrital)	Jan-Ago1997	104	31/104 (29,81%)	1998	Liu, P. Y. F. <i>et al.</i>

África					
Camarões (hospital central Yaounde)	Abr2005- Mar1998	259 <i>Klebsiella</i> spp 64 (24,71%)	12/64(18,80%)	2005	Gangoué- Piéboji, J. <i>et al.</i>
Tanzânia (hospital terciário de referência em Dar es Salaan)	Ago2001- Ago2002	250 52 (20,8%)	9/52(17,00%)	2005	Blomberg, B. <i>et al.</i>
África do Sul	Jan1996- Dez1997	455 <sup>a</sup> 116 (25,49%)	27/116 (23,28%)	2003	Paterson, D. L. <i>et al.</i>
Austrália					
Austrália	Jan1996- Dez1997	455 <sup>a</sup> 71 (15,60%)	2/71 (2,82%)	2003	Paterson, D. L. <i>et al.</i>

\* programa de vigilância SENTRY;

<sup>a</sup> espécimens sanguíneos;

<sup>b</sup> espécimens do trato respiratório;

<sup>NI</sup> não informado.

## **1.5. Métodos Moleculares para Tipagem de Microrganismos com Finalidades Epidemiológicas**

Diversos métodos moleculares são aplicados em estudos epidemiológicos para tipagem de microrganismos responsáveis por infecções hospitalares. Esses métodos podem ser divididos em duas categorias: métodos fenotípicos e métodos genotípicos. Os métodos fenotípicos são aqueles que caracterizam os produtos da expressão gênica de forma a diferenciar os isolados. Perfil bioquímico, tipo de bacteriófago, presença de antígenos na superfície celular e perfil de sensibilidade a antibióticos são todos exemplos de fenótipos que podem ser avaliados. Como envolve a expressão de um gene, todas estas propriedades podem apresentar variação, baseadas em mudanças nas condições de crescimento, na fase de crescimento e em mutações espontâneas. Os métodos genotípicos, por sua vez, são aqueles que se baseiam na análise do material genético de um microrganismo e são caracterizados, mais frequentemente, pela fragmentação do cromossomo, por enzimas apropriadas. Os métodos genotípicos apresentam menor variação natural. No entanto, podem ser afetados por eventos genéticos como inserções ou deleções do DNA, ganho ou perda de DNA extracromossômico ou mutações aleatórias que criam ou eliminam sítios de reconhecimento, alterando a ação das endonucleases de restrição (Tenover, Arbeit e Goering, 1997).

## **1.6. Métodos Moleculares Aplicados em Estudo de Patógenos Hospitalares**

### **1.6.1. Métodos com base no estudo do DNA genômico**

- . análise do perfil plasmidial;
- . análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA genômico, após o tratamento com enzimas de restrição, e separação dos fragmentos pela eletroforese convencional (*restriction endonuclease analysis* - REA);
- . análise por *Southern hybridization*, utilizando probes específicos de DNA;
- . análise do perfil do DNA genômico utilizando eletroforese em campo pulsátil (*pulsed field gel electrophoresis* – PFGE);
- . reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR);

### 1.6.2. Métodos fenotípicos com base no estudo das proteínas

. *immunoblot fingerprint*;

. análise de proteínas celulares por eletroforese em gel de poliacrilamida;

. *multilocus enzyme electrophoresis*;

Todos os métodos podem ser caracterizados em termos de tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de realização e facilidade de interpretação (Tenover, Arbeit e Goering, 1997).

A tipabilidade refere-se à habilidade da técnica em produzir um resultado de tipagem para cada isolado. Isolados não tipáveis são aqueles que não fornecem resultados. Um método para ser considerado reprodutível deve gerar os mesmos resultados, quando uma mesma cepa for testada em repetidos ensaios laboratoriais. Estudos de tipagem de cepas coletadas durante períodos variáveis (semanas, meses ou anos), podem apresentar pequenas variações nos padrões de DNA genômico quando analisados pelas técnicas da análise plasmidial, PFGE e PCR (Van Belkum e Meis, 1984; Maslow, Mulligan e Arbeit, 1993). O poder discriminatório refere-se à capacidade da técnica em diferenciar isolados não relacionados epidemiologicamente. Idealmente, o método de tipagem deve ser capaz de reconhecer os isolados não relacionados, fornecendo resultados que nos permitam diferenciá-los (Maslow, Mulligan e Arbeit, 1993). A facilidade de realização reflete o custo dos reagentes apropriados e do equipamento, da complexidade do método e o esforço requerido para o aprendizado e a realização prática da técnica. A facilidade de interpretação envolve a obtenção de um resultado que seja claro, objetivo, de fácil compreensão (Tenover, Arbeit e Goering, 1997).

O quadro I refere-se às vantagens e desvantagens de diferentes métodos de tipagem molecular com base na análise do DNA.

**Quadro I:** Características das técnicas de tipagem molecular baseadas no DNA.

Método de tipagem	Proporção de cepas tipadas	Reprodutibilidade	Poder discriminatório	Facilidade de interpretação	Facilidade de execução
Plasmídio	maioria	boa	regular	moderada	moderada
REA	todas	boa	bom	difícil	moderada
RFLP com probes	todas	excelente	moderada	moderada	difícil
PFGE	todas	excelente	excelente	moderada	moderada
PCR	todas	boa	boa	moderada	moderada

Adaptado de Tenover, Arbeit e Goering, (1997)

## 1.7. Métodos Genotípicos

### 1.7.1. Técnica para a análise plasmidial

Os plasmídios são elementos genéticos extracromossômicos que podem transferir informação genética entre diferentes bactérias. A análise plasmidial foi o primeiro método genotípico a ser aplicado em estudos de epidemiologia molecular (Arber e Mackel, 1981; Schaberg, Tompkins e Falkows, 1981), tendo sido empregado, primeiramente para estudar a relação entre padrões não usuais de resistência bacteriana aos antimicrobianos (Arber e Mackel, 1981). As técnicas atuais de extração do DNA plasmidial permitem o isolamento rápido dos plasmídios e utilizam um sistema de eletroforese bastante simples para suas separações, tornando esse método apropriado ao uso por diversos laboratórios clínicos. O acréscimo da digestão do DNA plasmidial por enzimas conhecidas como endonucleases de restrição ou simplesmente enzimas de restrição aumenta o poder discriminatório e a reprodutibilidade da técnica (Townsend *et al.*, 1985). Algumas cepas bacterianas, em especial os *Staphylococcus aureus*, contêm apenas um grande plasmídio, frequentemente de peso molecular entre 100 a 150 quilobases (kb). Nesses casos a adição da enzima de restrição permite aumentar o poder discriminatório da eletroforese (Pfaller *et al.*, 1991). No entanto, as bactérias gram-negativas usualmente apresentam um número maior de plasmídios sendo desnecessária, muitas vezes, o tratamento com enzimas de restrição (Seifert *et al.*, 1984; Marcos, Jimenez de Anta e Vila., 1985; Getchell-White *et al.*, 1989; Patterson, Vecchio e Pantelick., 1991).

A análise do DNA plasmidial possui vantagens e desvantagens. Os plasmídios podem disseminar-se de uma bactéria para outra e portanto o encontro de cepas contendo o mesmo perfil plasmidial pode significar que o plasmídio tem o caráter epidêmico e não a cepa bacteriana (Farrar, 1983). Ainda, a cepa epidêmica pode não conter plasmídios; cepas não relacionadas podem apresentar o mesmo plasmídio; os plasmídios estão sujeitos a rearranjos estruturais e por serem elementos extracromossômicos, a bactéria pode perder ou ganhar plasmídios não relacionados ao surto. Como vantagens temos a aplicabilidade em estudos de vários gêneros e espécies bacterianos, facilidade e rapidez de execução, boa reprodutibilidade e baixo custo (Wachsmuth, 1986; Eisenstein, 1990a; Lupski, 1993).

### 1.7.2. Técnica eletroforética para análise do DNA cromossômico

Existem dois métodos de tipagem de microrganismos com base nos padrões de fragmentos produzidos pela clivagem do DNA cromossômico com enzimas de restrição. O primeiro método, usualmente conhecido como convencional, refere-se à extração do DNA e à digestão com enzima de restrição que realiza a clivagem do DNA produzindo inúmeros fragmentos. Nesse procedimento, os fragmentos de DNA são submetidos à corrida eletroforética comum em gel de agarose. Os fragmentos de 0,5 a 2,5 kb apresentam-se como várias bandas visíveis ou como uma única banda, enquanto fragmentos maiores não são capazes de migrar através do gel, ficando retidos na sua porção superior. A segunda técnica baseia-se na utilização da PFGE, capaz de separar fragmentos de 1 kb até 1000 kb (1 megabase), usando enzimas de restrição de baixa frequência de clivagem do DNA, gerando de 10 a 30 bandas no gel de agarose (Tenover, Arbeit e Goering, 1997).

### 1.7.3. Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição de clivagem frequente e eletroforese convencional

Cada enzima de restrição cliva o DNA cromossômico em uma sequência particular de nucleotídeos, sequência esta que pode estar repetida inúmeras vezes no cromossomo. O número e o tamanho dos fragmentos gerados refletem a frequência e a distribuição em que essa sequência é repetida. O padrão de bandas gerado por esse método, no qual a distinção entre os isolados bacterianos é feita com base no número e tamanho dos fragmentos, é denominado *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP). Os inúmeros fragmentos separados pela eletroforese convencional, resultantes da digestão, dificultam a análise comparativa das cepas. Entretanto, para algumas bactérias e leveduras, essa técnica tem-se mostrado útil, como nos estudos de surtos envolvendo *Clostridium difficile* (Peterson e Kelly, 1993) e *Candida tropicalis* (Doebelling *et al.*, 1991).

Os fragmentos gerados pelo tratamento do DNA cromossômico podem ser transferidos para uma membrana de nitrocelulose (*Southern blot*) e incubados com probes de DNA, marcados com isótopos radioativos ou substâncias quimioluminescentes. O probe liga-se apenas às regiões que possuem sequência complementar de DNA, e assim podem ser visualizadas pela apropriada exposição da membrana a um filme fotográfico. Quanto mais relacionados entre si forem os microrganismos, as sequências serão mais identificadas

pelo probe, produzindo assim padrões de bandas idênticos ou semelhantes. No entanto, o poder discriminatório desta técnica é afetado pelo tipo de probe empregado, ou seja, o probe direcionado a uma região que se repete frequentemente no cromossomo produzirá padrões de maior número de bandas no gel e, portanto, uma melhor discriminação em relação aos probes que detectam poucas sequências no cromossomo (Weber, Pfaller e Herwaldt, 1997). RFLP utilizando o probe IS110 tem sido aplicado especialmente nos estudos de transmissão cruzada e epidemias de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes HIV-positivos (Daley, Small, Schecter, 1992; Torrea, Offredo, Simonet, 1996).

#### 1.7.4. Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição e PFGE

Os fragmentos de DNA maiores que 20 a 25 kb não são separados pela eletroforese convencional que utiliza um único campo elétrico unidirecional. A introdução em 1984 da PFGE permitiu a separação de grandes fragmentos de DNA (40 a 1000 kb) em gel de agarose (Schwartz e Cantor, 1984). A capacidade de separação de grandes moléculas foi facilitada alterando a direção do campo elétrico. O número de fragmentos é limitado pelo uso de enzimas de restrição que reconhecem os sítios específicos que ocorrem com uma determinada frequência no genoma do microrganismo. O campo elétrico da eletroforese é aplicado em uma direção, por um primeiro grupo de eletrodos, por um curto período de tempo (pulso). A seguir, a direção da corrente é alterada para um segundo grupo de eletrodos e depois para um terceiro. Dessa forma, devido à alternância de direções, o DNA consegue movimentar-se através do gel de agarose, resultando em um alto grau de resolução dos fragmentos no gel (Chu, Vollrath e Davis., 1986).

A PFGE apresenta importantes vantagens quando comparada às demais técnicas de tipagem molecular, como análise plasmidial, REA e *Southern blot* entre outras, pois o DNA cromossômico é tratado com enzimas de restrição de baixa frequência de clivagem, fornecendo de 10 a 30 bandas o que permite excelente resultado. Outra vantagem é que o método não necessita de probes, além de ser altamente reprodutível e possuir excelente poder discriminatório, para distinguir cepas endêmicas de não endêmicas. A PFGE pode ser aplicada em uma série de microrganismos, em especial as bactérias (Goering, 1993; Swaminathan e Matar, 1993; Maslow *et al.*, 1995) e as leveduras. Uma das poucas

desvantagens do método está no alto custo do equipamento e na demorada e trabalhosa execução (Pfaller, 1992).

## ***2. JUSTIFICATIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO PROPOSTO***

Cepas de *K. pneumoniae*, de *E. coli* e de outros bacilos gram-negativos produtores de ESBLs são descritos em literaturas de muitas partes do mundo. Elas são provavelmente mais prevalentes do que as atuais descrições, considerando as dificuldades de detecção efetiva e rápida pelos laboratórios clínicos, o que contribui para a contínua transmissão destas bactérias mundo afora. Tipicamente, as ESBLs são reconhecidas pela resistência incomum que elas proporcionam aos seus hospedeiros bacterianos. No entanto, em algumas cepas, um fenótipo intermediário ou mesmo sensível a certos antibióticos pode ocorrer. Merece destaque a habilidade das ESBLs em escapar à detecção no teste de sensibilidade pelo método de disco-difusão que utiliza simplesmente os valores dos diâmetros dos halos de inibição estabelecidos para a classificação em sensível, intermediário ou resistente, o que causa preocupação pois cepas produtoras de ESBLs podem ser classificadas como sensíveis a certos antibióticos, quando na realidade elas deveriam ser classificadas como resistentes. Algumas ESBLs, no entanto, conferem elevado nível de resistência a todos os oximinos beta-lactâmicos, mas para outras ESBLs a resistência é apenas levemente aumentada ou aumentada seletivamente para certos beta-lactâmicos, o que dificulta o trabalho do laboratório clínico em identificar facilmente tais cepas. A detecção de cepas produtoras de ESBLs, por sua vez, possui tanto importância epidemiológica, para que medidas de controle e prevenção sejam implantadas, como importância terapêutica, pois para todas as cepas comprovadamente tidas como produtoras de ESBLs a interpretação do teste de sensibilidade deverá relatar resistência à todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam, garantindo a instituição da terapêutica antimicrobiana adequada. Ademais, a resistência antimicrobiana dentre os patógenos nosocomiais é um problema significativo na maioria dos ambientes clínicos, adicionando custos à instituição decorrentes do cuidado médico e ainda, podendo ocasionar aumento nos índices de mortalidade e morbidade de pacientes.

É importante que o laboratório clínico realize provas adicionais e investigue prontamente a possível presença de cepas produtoras de ESBLs pois a constatação de um insucesso terapêutico ou mesmo de um surto causado por bactérias produtoras de ESBLs podem ser tardiamente reconhecidos, se forem utilizados somente testes tradicionais de rotina, despertando a atenção somente após a situação ter tomado proporções lamentáveis.

Entretanto, o melhor teste laboratorial para a detecção de microrganismos produtores de ESBLs não foi ainda identificado. Há relatos da utilidade do teste de aproximação de discos (sinergismo) e dos bons resultados apresentados pelo disco de cefpodoxima.

Desta forma, o estudo proposto traz esclarecimentos sobre a frequência das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs isoladas nas respectivas instituições, a relação genética entre estas cepas, a situação clínica dos pacientes dos quais tais patógenos foram isolados, os melhores antibióticos utilizáveis para a detecção de tais agentes nosocomiais e a aplicabilidade dos testes empregados. Talvez o aprimoramento na detecção das cepas produtoras de ESBLs possa fornecer uma avaliação mais precisa da sua distribuição convergindo para o uso criterioso de agentes antimicrobianos, o que por sua vez, poderá reduzir a seleção e a disseminação de microrganismos produtores destas enzimas.

### ***3. OBJETIVOS***

3.1. Determinar a presença de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs isolados de pacientes com infecção nosocomial nos hospitais HMMG e HC nos anos de 2001, 2002, 2003 e 2004;

3.2. Descrever as características clínicas de pacientes dos quais foram isoladas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs;

3.3. Estudar a relação genética das cepas de *K. pneumoniae* e a aplicabilidade dos métodos genotípicos utilizados;

3.4. Avaliar a sensibilidade dos discos de antibióticos na detecção de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs;

3.5. Determinar o(s) fator(es) de risco para infecção nosocomial por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs.

## ***4. CASUÍSTICA E MÉTODOS***

## **4.1. População de Estudo**

Foi constituída por pacientes internados no Hospital de Clínicas (HC) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP), durante os anos de 2001, 2002 e por pacientes internados no Hospital Municipal Dr Mario Gatti (HMMG) no período de junho de 2003 a junho de 2004, que apresentaram evidências clínicas de infecção nosocomial por *K. pneumoniae*.

O HC-UNICAMP é um hospital universitário dotado de 403 leitos, servindo como hospital de referência para uma população de mais de um milhão de pessoas na região metropolitana de Campinas. Por sua vez, com 230 leitos (200 operacionais e 30 de retaguarda), o HMMG é uma autarquia pública municipal mantida com recursos do SUS e da Prefeitura Municipal de Campinas. É reconhecido como hospital terciário, de ensino e pesquisa pelos Ministérios da Saúde e da Educação e atualmente oferece bolsa para médicos residentes em 10 especialidades: cirurgia geral, clínica médica, cirurgia plástica, cirurgia vascular, neurocirurgia, ortopedia e traumatologia, pediatria, urologia, saúde da família e comunidade e buco-maxilo.

## **4.2. Métodos Aplicados**

### 4.2.1. Análise microbiológica

- Isolados bacterianos

As cepas de *K. pneumoniae*, obtidas de diversos espécimens clínicos, previamente identificadas pelos laboratórios de microbiologia de seus respectivos hospitais foram armazenadas em caldo BHI glicerinado (15%) a -70°C no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Bactérias e Fungos da FCM-UNICAMP. Posteriormente, foram reisoladas para a realização deste estudo.

### 4.2.2. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo epidemiológico do tipo descritivo com coleta de dados realizada de forma retrospectiva em prontuários, e um estudo de validação de técnicas laboratoriais para a detecção de cepas produtoras de ESBLs e caracterização genética de cepas de *K. pneumoniae*, avaliando principalmente a sensibilidade, a reprodutibilidade, o poder discriminatório e a aplicabilidade das técnicas.

**Primeira fase:** Levantamento do número de pacientes com infecção nosocomial por *K. pneumoniae*.

Foram utilizadas as informações existentes no banco de dados disponível nos respectivos laboratórios. Todos os pacientes hospitalizados que apresentaram infecção nosocomial por *K. pneumoniae* foram incluídos nesta fase do estudo.

**Segunda fase:** Localização das cepas de *K. pneumoniae*.

A partir dos dados de pacientes com infecção nosocomial por *K. pneumoniae* realizou-se a busca das respectivas cepas, reisolando-as em meios de cultura apropriados.

**Terceira fase:** Identificação das cepas de *K. pneumoniae* possivelmente produtoras de ESBLs (testes de triagem).

Teste de todas as cepas para a detecção das possíveis produtoras de ESBLs;

**Quarta fase:** Identificação das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs (testes confirmatórios).

As cepas possivelmente produtoras de ESBLs foram submetidas a testes para a confirmação da produção de ESBLs;

**Quinta fase:** Análise do perfil molecular com base no estudo plasmidial e cromossômico.

Todas as cepas de *K. pneumoniae* do período de estudo foram submetidas à análise do DNA plasmidial, utilizando a eletroforese convencional e à análise do DNA cromossômico, utilizando a PFGE.

**Sexta fase:** Coleta de dados clínicos.

A execução desta fase envolveu a consulta de todos os sistemas de registro disponíveis para a coleta de dados, possibilitando assim, a caracterização clínica dos pacientes acometidos por infecção nosocomial por cepas de *K. pneumoniae*.

#### 4.2.3. Critérios de exclusão

Para o estudo das características clínicas foram excluídos todos os pacientes cujos prontuários médicos não foram localizados ou aqueles cujas informações contidas nos prontuários não estavam devidamente descritas. Da mesma forma, houve exclusão de pacientes nos quais não foi constatada infecção nosocomial e pacientes cujas cepas bacterianas não foram encontradas e/ou não estavam viáveis para a análise microbiológica. Pacientes cujas cepas eram resistentes à cefoxitina também tiveram sua exclusão efetuada.

#### 4.2.4. Critérios de inclusão

Foram utilizadas as definições do CDC (1988) para a identificação das infecções nosocomiais (Garner *et al.*, 1988). Considerando, ainda, a existência de cepas repetidas, houve a inclusão somente da cepa primeiramente isolada.

#### 4.2.5. Coleta de dados

Os dados clínicos, evolução e possíveis fatores de risco presentes nos pacientes com infecção nosocomial por *K. pneumoniae* foram coletados utilizando ficha apropriada (**Anexo I**), a partir da revisão de prontuários e/ou outros sistemas de registro disponíveis.

#### 4.2.6. Detecção das cepas de *K. pneumoniae* possivelmente produtoras de ESBLs

Para a detecção das cepas de *K. pneumoniae* **possivelmente produtoras** de ESBLs foram utilizados o teste da mensuração do diâmetro dos halos de inibição produzidos por discos de papel de filtro impregnados com diferentes antibióticos e o teste de aproximação de discos (sinergismo). Os discos foram aplicados em placas de ágar Mueller-Hinton, previamente inoculadas com uma suspensão da cepa de *K. pneumoniae* em estudo. A incubação foi realizada a 35°C, em condições de aerobiose por 16-18 horas.

Para o teste da mensuração do halo de inibição foram utilizados os seguintes antibióticos: aztreonam, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima e ceftazidima. As concentrações de cada antibiótico, bem com os valores dos seus respectivos halos de inibição encontram-se na Tabela 5, segundo as recomendações do CLSI, de 2005.

**Tabela 5:** Concentração dos diferentes antibióticos e valores dos halos de inibição para a identificação das cepas de *K. pneumoniae* possivelmente produtoras de ESBLs.

Antibiótico	Concentração	Halo de inibição
Aztreonam	30 µg	≤ 27 mm
Ceftriaxona	30 µg	≤ 25 mm
Cefotaxima	30 µg	≤ 27 mm
Cefpodoxima	10 µg	≤ 17 mm
Ceftazidima	30 µg	≤ 22 mm

Valores iguais ou inferiores aos descritos na tabela foram interpretados como cepa possivelmente produtora de ESBLs.

Para o teste de aproximação de discos (sinergismo), foram utilizados os seguintes antibióticos: aztreonam, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima e ceftazidima, nas mesmas concentrações das utilizadas no teste da mensuração dos halos de inibição, posicionados a uma distância de 2,5 mm (centro a centro) de um disco de amoxicilina mais ácido clavulânico (20 µg e 10 µg, respectivamente). Deformação da borda da zona de inibição compreendida entre o disco contendo o antibiótico e o disco contendo a combinação (clavulanato mais o antibiótico) foi considerada como teste positivo para o efeito sinérgico.

#### 4.2.7. Teste confirmatório para a detecção das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs

Foi utilizado o método de discos combinados (combinação com o ácido clavulânico), segundo as recomendações do CLSI (2005).

O teste confirmatório utilizou os discos de cefotaxima (30 µg) e ceftazidima (30 µg) isolados e discos contendo a combinação de cefotaxima (30 µg) mais ácido clavulânico (10 µg) e ceftazidima (30 µg) mais ácido clavulânico (10 µg). A cepa apresentando um aumento igual ou superior a 5 mm no valor do diâmetro do halo de inibição do disco contendo a combinação, comparado com o valor do diâmetro do halo de inibição do disco contendo somente o antibiótico (sem o ácido clavulânico) foi considerada produtora de ESBLs.

Para a coleta dos dados dos testes para a identificação e confirmação das cepas produtoras de ESBL, foram utilizadas fichas apropriadas (**Anexos II e III**).

#### 4.2.8. Preparo das placas para a aplicação dos discos contendo antibióticos

Para os testes envolvendo a difusão de antibióticos impregados em discos de papel de filtro foi utilizado o método de Kirby-Bauer (1966).

Foi utilizado o meio de Mueller-Hinton preparado de acordo com as recomendações do fabricante (Oxoid®). O meio previamente esterilizado a 121 °C (1 atmosfera de pressão) por 15 minutos e resfriado a aproximadamente 45°C foi adicionado a cada placa de Petri na quantidade necessária para formar uma camada de 4 mm de espessura.

#### 4.2.9. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, utilizou-se o método do crescimento bacteriano em caldo de BHI (*brain heart infusion*). A suspensão bacteriana, para a realização do teste de mensuração e o teste do sinergismo, foi preparada de forma a conter aproximadamente  $10^8$  UFC por mL. Cerca de 5 colônias do microrganismo em questão, isoladas em placas de ágar MacConkey, eram transferidas com auxílio de agulha estéril para um tubo contendo caldo BHI. O tubo era incubado a 35 °C, por cerca de 1 hora, até que se obtivesse a turvação recomendada. Para tanto, comparou-se a suspensão bacteriana com um padrão de turbidez (padrão 0,5 da escala de McFarland, utilizando BaSO<sub>4</sub>; **Anexo IV**).

#### 4.2.10. Semeadura das placas

No tubo contendo a suspensão bacteriana, na turvação recomendada, era mergulhado um suabe de algodão estéril. Pressionando-o contra a parede do tubo, retirava-se o excesso de suspensão, e em seguida, o suabe era passado sobre a superfície do meio de Mueller Hinton de maneira uniforme, deixando a placa em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos.

#### 4.2.11. Variáveis e conceitos

As variáveis e os conceitos pertinentes ao presente estudo encontram-se descritos no **Anexo V**.

#### 4.2.12. Aplicação dos discos

Os discos foram aplicados manualmente com auxílio de uma pinça esterilizada. Os discos eram levemente pressionados contra a superfície do meio e dispostos a pelo menos a

2 cm da borda da placa. As placas foram incubadas a 35 °C, em condições de aerobiose, por 16-18 horas. A interpretação dos valores do diâmetro dos halos de inibição para os antibióticos utilizados encontra-se no **Anexo VI**.

#### 4.2.13. Controle de qualidade

O controle de qualidade dos discos de papel-filtro impregnados com os antibióticos utilizados foi realizado utilizando-se as seguintes cepas ATCC®: *Escherichia coli* 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (Tabela 6).

**Tabela 6:** Valores dos intervalos permitidos para o diâmetro dos halos de inibição, utilizando cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

Antibiótico	Concentração	Intervalo permitido (mm)	
		<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853
Aztreonam	30 µg	28-36	23-29
Ceftriaxona	30 µg	29-35	17-23
Cefotaxima	30 µg	29-35	18-22
Cefoxitina	30 µg	23-29	-
Cefpodoxima	10 µg	23-28	-
Ceftazidima	30 µg	25-32	22-29
AMC	20/10 µg*	18-24	-

\*, concentrações referentes à amoxicilina e ácido clavulânico, respectivamente; AMC, amoxicilina mais ácido clavulânico; ATCC®, *American type culture collection*; -, inexistente para o antibiótico em questão.

#### 4.2.14. Aquisição dos discos contendo antibióticos

Os discos utilizados no presente estudo foram obtidos comercialmente (Oxoid®).

#### 4.2.15. Análise do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o método modificado de *Cetyltrimethyl ammonium bromide*, de Townsend e cols., (1985).

As cepas de *K. pneumoniae* foram semeadas inicialmente em placas de ágar MacConkey e subcultivadas em placas contendo ágar BHI e incubadas por 18 a 24 horas a 35 °C.

As células bacterianas foram suspensas em tubos contendo 3 mL da solução NaCl 2,5 M; EDTA 10 mM (pH 8,0) e centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos a 20 °C. As células eram então ressuspensas em 900 µL da solução contendo: sacarose 20%; TRIS 50 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM (pH 8,0) e a seguir, eram adicionados 100 µL de lisozima (10 mg/mL), incubando as células em banho-maria por 1 hora a 37 °C.

A lise das células foi promovida com a adição de 1 mL da solução contendo: NaCl 2,5 M; EDTA 10 mM (pH 8,0).

A seguir, era adicionado 1 mL da solução (volume/volume) contendo ATAB 0,5% (*alkyltrimethylammonium bromide*) mais 0,25% Triton X-100. Os tubos eram cuidadosamente invertidos para a homogeneização e aquecidos a 60°C (banho-maria) por

10 minutos para a completa lise das células bacterianas, e a suspensão era centrifugada a 18000 rpm, por 1 hora a 20 °C. O sobrenadante era transferido para novos tubos onde adicionava-se 5 ml de ATAB 0,5 %. O material era refrigerado a -20°C, por 15 minutos e então centrifugado a 6000 rpm, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante era desprezado e a película residual presente na lateral do tubo era ressuspensa em 250 µL da solução contendo NaCl 2,5 M; EDTA 10 mM (pH 8,0). Em seguida, eram adicionados 500 µL de *TE High Molarity* pH 8,0 (solução contendo TRIS 0,1 M, pH 8,0 e EDTA 0,1 M, pH 8,0).

Seguia-se, então, à adição de 5 µL de RNase (10 mg/mL), sendo os tubos reincubados a 37 °C (banho-maria) por 30 minutos. A seguir, prosseguia-se com a extração utilizando 1 mL da solução contendo clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 24:1, respectivamente). Os tubos eram então centrifugados a 7000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

A fase aquosa era transferida para um tubo *ependorf* onde era adicionado álcool isopropílico gelado (-20 °C). Em seguida, os tubos eram centrifugados a 12000 rpm, por 3 a 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante, após o procedimento. O precipitado era lavado com 1mL de etanol gelado (-20 °C) e centrifugado novamente.

O sobrenadante era desprezado, deixando que o álcool residual evaporasse à temperatura ambiente, por uma noite ou por 1 hora a 37 °C (estufa).

A película remanescente era ressuspensa em 100 µL de *TE High Molarity* e armazenada a 4°C. Para a verificação rápida da presença de plasmídios, 20 µL da suspensão mais 5 µL de corante azul de bromofenol eram submetidos à eletroforese convencional em gel de agarose (agarose 0,7% em solução tampão de TBE 1X [Tris, Ácido bórico, EDTA]), seguindo as seguintes condições: 60 volts de corrente elétrica, por 6 horas. Um marcador de peso molecular (*Supercoiled DNA Ladder*) era aplicado na primeira canaleta de cada gel para a estimativa do tamanho dos plasmídios obtidos, visualizados na forma de pequenas bandas. A seguir, os géis eram corados com brometo de etídio e fotografados sob ação da luz ultravioleta. A base para a identificação das cepas foi realizada relacionando o número e o tamanho dos plasmídios presentes em cada cepa (Seifert *et al.*, 1994).

#### 4.2.16. Análise do DNA cromossômico por PFGE

O DNA genômico foi preparado segundo o método de Goering e Duensing (1990) modificado. Cinco a dez colônias de *K. pneumoniae*, isoladas a partir de culturas em placas

de ágar MacConkey, eram semeadas em 10 mL de caldo BHI e incubadas por 24 horas a 37 °C, sob agitação mecânica.

A suspensão era centrifugada (5000 rpm) por 5 minutos a 20 °C e o sobrenadante era totalmente desprezado. As células bacterianas eram padronizadas por peso e diluídas mantendo-se igualmente a proporção peso/volume. Para tanto, o precipitado era ressuspenso em 1 mL de solução salina estéril e a suspensão era transferida para tubos *ependorfs* estéreis pré-pesados, sendo centrifugados (12000 rpm) por 5 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante era completamente desprezado e os tubos eram novamente pesados. A diferença entre os pesos dos tubos (vazio e com o sedimento) era então calculada.

Adicionava-se em cada tubo o volume, em microlitros (correspondente à diferença obtida) de tampão *TEN* (TRIS 100mM, pH 7,5; EDTA 100mM, pH 7,5; NaCl 150mM) e o precipitado era ressuspenso pela agitação em vórtex.

Um volume de 20 µL desta suspensão era transferido para outro tubo *ependorf*, no qual eram adicionados 300 µL de tampão *TEN*.

Em cada tubo foi adicionado o volume de 340 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (*Low Melt Agarose*; BioRad) e o preparado era dispensado em moldes acrílicos e refrigerado a 4°C, por 30 minutos. Os blocos de agarose eram dispensados em microplacas e incubados durante uma noite a 37°C em 2 mL de tampão *EC* pH 7,5 (Tris 0,006M, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,1M, pH 7,5; BRIJ-58 0,5%; *Deoxycholate Na* 0,2%; *Sarkosyl* 0,5%) mais Lisozima (2mL de tampão *EC* mais 200 µL de Lisozima 20 mg/ mL).

A solução tampão era aspirada e os blocos de agarose eram lavados com 2 mL de *TE high molarity* por 4 vezes, com intervalos de lavagem de 1 hora, sempre mantidos sob agitação mecânica, à temperatura de 22 °C. Após a última lavagem, os blocos eram incubados a 50 °C durante toda a noite com 2 mL de solução *ESP* (EDTA 0,5M, pH 9,3; *N-Lauroylsarcosine* 1%; *Proteinase K* 0,1 mg/mL).

Os blocos eram então 4 vezes lavados com *TE high molarity*, mantendo-se um intervalo de 1 hora entre cada lavagem, à temperatura ambiente. Ao final das lavagens os blocos foram estocados a 4°C em 2 mL de *TE high molarity* ou realizava-se a etapa do tratamento do material genético com enzima de restrição.

Para a etapa do tratamento do material genético com enzima de restrição *SpeI* os blocos previamente obtidos eram 4 vezes lavados com solução *Dummy no salt* (Tris, 0,1 M, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 5 mM) sob agitação mecânica à temperatura de 22°C.

Os blocos de agarose, contendo o material genético a ser analisado, eram transferidos para outro tubo *eppendorf*, ao qual era adicionado volume de 200 µL da solução tampão da enzima *SpeI*. Durante meia hora os blocos permaneciam na geladeira e após este período, a solução tampão era aspirada e o volume de 200µL da solução contendo a enzima *SpeI*, preparada de acordo com as recomendações do fabricante, era adicionado em cada tubo, mantendo-os incubados durante uma noite a 37°C.

Os blocos de agarose contendo o DNA submetido a ação da endonuclease de restrição *SpeI* eram inseridos em gel de agarose a 1% em solução tampão *TBE* 0,5 X (Tris; Ácido bórico; EDTA) com tiouréia 25 mM (Silbert *et al.*, 2003) e os fragmentos digeridos eram separados pela eletroforese em campo pulsátil, usando o sistema CHEF-DRII (*contour-clamped homogeneous electric field*; Bio Rad Labs. Richmond, Ca.). A eletroforese era realizada em campo elétrico de 6 volts, por 18 horas e tempo de pulsos intercalados de 5 e 60 segundos, a 14 °C. Um marcador de peso molecular (*Lambda Ladder PFG Marker*) era inserido no primeiro poço de cada gel para a estimativa do tamanho dos fragmentos formados. Após a corrida eletroforética o gel era corado pelo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob ação da luz ultravioleta.

- Análise comparativa dos isolados bacterianos

Os perfis cromossômicos observados foram denominados por letras em ordem alfabética seqüencial para facilitar a análise. A relação de similaridade entre dois isolados foi estimada com base nos critérios de interpretação de padrões de fragmentos de bandas, produzidos pelo tratamento do DNA cromossômico com enzima de restrição, segundo Tenover *et al.*, (1995).

- Categorias de relação genética e epidemiológica, segundo Tenover *et al.*, (1995).

- **Isolados iguais:** Dois isolados são considerados **geneticamente** idênticos quando os padrões de fragmentos de restrição presentes em ambos os isolados apresentam o mesmo

número de bandas com o mesmo peso molecular. A interpretação **epidemiológica** desses resultados é a de que os isolados são derivados de uma mesma cepa;

- **Isolados intimamente relacionados:** Um isolado é considerado intimamente relacionado à cepa do surto quando seu padrão de bandas, obtido pela PFGE, diferir do padrão da cepa do surto em duas a três bandas;

- **Isolados possivelmente relacionados:** Um isolado é considerado possivelmente relacionado à cepa do surto quando as modificações consistirem em até dois eventos genéticos independentes, ou seja, a observação de 4 a 6 bandas diferentes, diferenças estas explicáveis por simples inserções ou deleções de DNA ou por ganho ou de perda de sítios de restrição;

- **Isolados não relacionados:** Um isolado é considerado não relacionado à cepa do surto quando o perfil do DNA cromossômico, obtido pela PFGE, diferir do perfil da cepa do surto em 3 ou mais eventos genéticos independentes, o que corresponde, geralmente, a diferenças de 7 ou mais bandas.

#### 4.2.17. Processamento e análise dos dados obtidos da PFGE

Para a análise dos perfis do DNA cromossômico obtidos pela PFGE e a confecção de dendrograma foi utilizada a análise computacional (*Bio-Capt MW*, versão 99; *M&S Instruments Trading Inc*), com base no coeficiente de similaridade de Dice, após a captação das imagens por um sistema fotográfico IS-1000 digital. O dendrograma assim construído forneceu a demonstração gráfica da similaridade (Dice, 1945).

#### 4.2.18. Análise estatística

Os dados coletados de forma padronizada foram analisados usando o *SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.1.3 *service pack*. *SAS Institute Inc*, 2002-2003, Cary, NC, EUA.

As variáveis categóricas foram comparadas usando os testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriados.

As variáveis contínuas foram comparadas usando o teste *Mann-Whitney*.

As análises uni e multivariadas foram realizadas para todas as variáveis estatisticamente significantes, escalonadas pela regressão logística do tipo *stepwise* e

apresentadas sob a forma de *odds ratio* com um intervalo de confiança de 95% para a identificação dos fatores de risco para a aquisição de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs. Um *P* valor < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **5. ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo teve sua aprovação emitida pelo Conselho de Ética em Pesquisa da UNICAMP/Faculdade de Ciências Médicas (Folha de Rosto 73410; número do documento 1586.0.146.000-05). Pela inexistência de contato direto com pacientes houve liberação do termo de consentimento livre e esclarecido.

## ***6. RESULTADOS***

Durante o período de estudo, 162 cepas de *K. pneumoniae* isoladas de 140 pacientes hospitalizados foram localizadas. No entanto, um total de 89 foram incluídas no presente trabalho por adequação aos critérios de inclusão. A descrição da situação das cepas localizadas encontra-se resumida na Tabela 7 .

Tabela 7: Situação das cepas de *K. pneumoniae* localizadas para inclusão no presente trabalho.

Situação	Hospital		Total
	HC	HMMG	
Número de cepas estocadas	82	80	162
Número de cepas não repetidas	73	67	140
Número de cepas resistentes à cefoxitina	2	10	12
Número de cepas sensíveis à cefoxitina	67	55	122
Número de cepas com sensibilidade intermediária à cefoxitina	4	2	6
Número de prontuários inapropriados	19	14	33
<b>Número de cepas incluídas no estudo</b>	<b>48</b>	<b>41</b>	<b>89</b>

Legenda: HC, Hospital de Clínicas/UNICAMP; HMMG, Hospital Municipal Dr. Mario Gatti.

## 6.1. Detecção de Cepas Produtoras de ESBLs

### 6.1.1. Testes de triagem para a identificação das prováveis cepas produtoras de ESBL

#### 6.1.1.1. Teste de aproximação de discos (sinergismo)

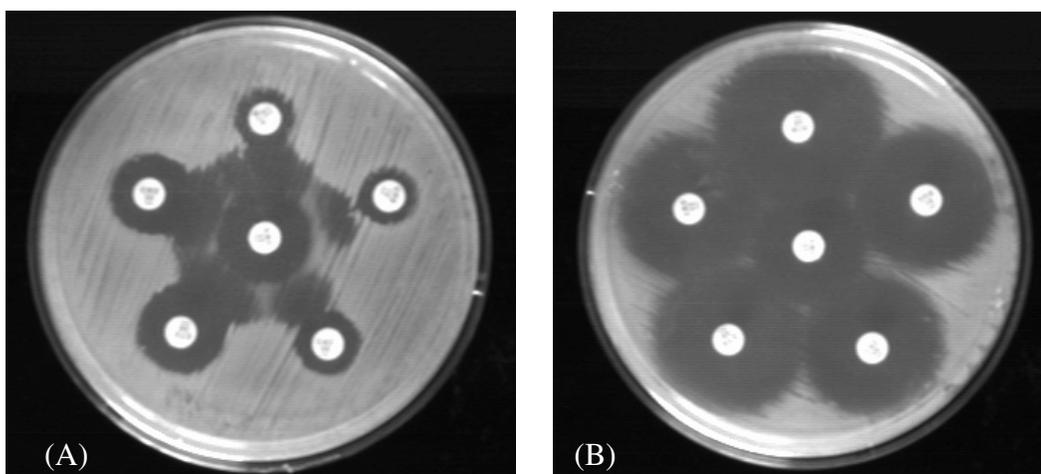
Distorções induzidas pela molécula de clavulanato, indicativas de provável produção de ESBLs, foram encontradas em 96,0%, 62,5%, 50,0%, 18,8% e 12,5% das cepas ao redor dos discos contendo aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefpodoxima, respectivamente, identificando 32 prováveis cepas produtoras de ESBLs (Figura 1).

#### 6.1.1.2. Mensuração do diâmetro da zona de inibição

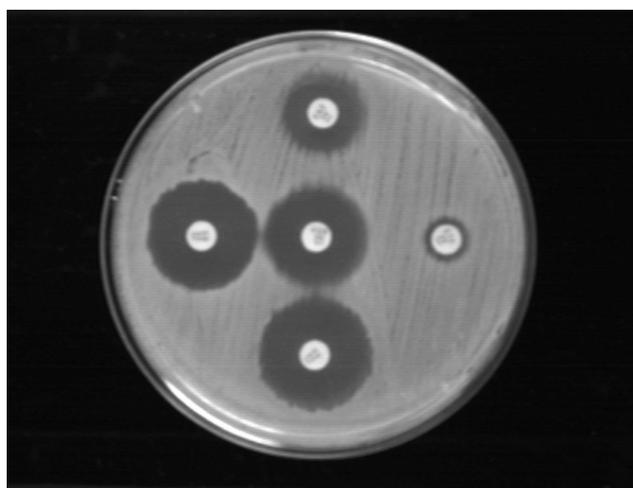
Todos os discos contendo seus respectivos antibióticos foram capazes de identificar presuntivamente a produção de ESBLs, indicada pela redução do valor do diâmetro do halo da zona de inibição, segundo os critérios propostos pelo CLSI. Foi observada a redução da zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco contendo ceftriaxona em 3 cepas não produtoras, o mesmo ocorrendo para o disco de cefotaxima em 2 cepas também não produtoras de ESBLs.

### 6.1.2. Testes confirmatórios da produção de ESBLs

A investigação das cepas produtoras de ESBLs foi realizada, submetendo todas as 32 cepas possivelmente produtoras aos testes confirmatórios. Considerando os dois substratos testados em combinação com a molécula de ácido clavulânico (ceftazidima e cefotaxima), foi observada a confirmação simultânea da produção enzimática em 30 (93,8%) cepas. O disco contendo cefotaxima apresentou superior capacidade de confirmação (32 cepas), enquanto que o disco contendo de ceftazidima não foi capaz de confirmar 2 cepas produtoras de ESBLs (Figura 2).



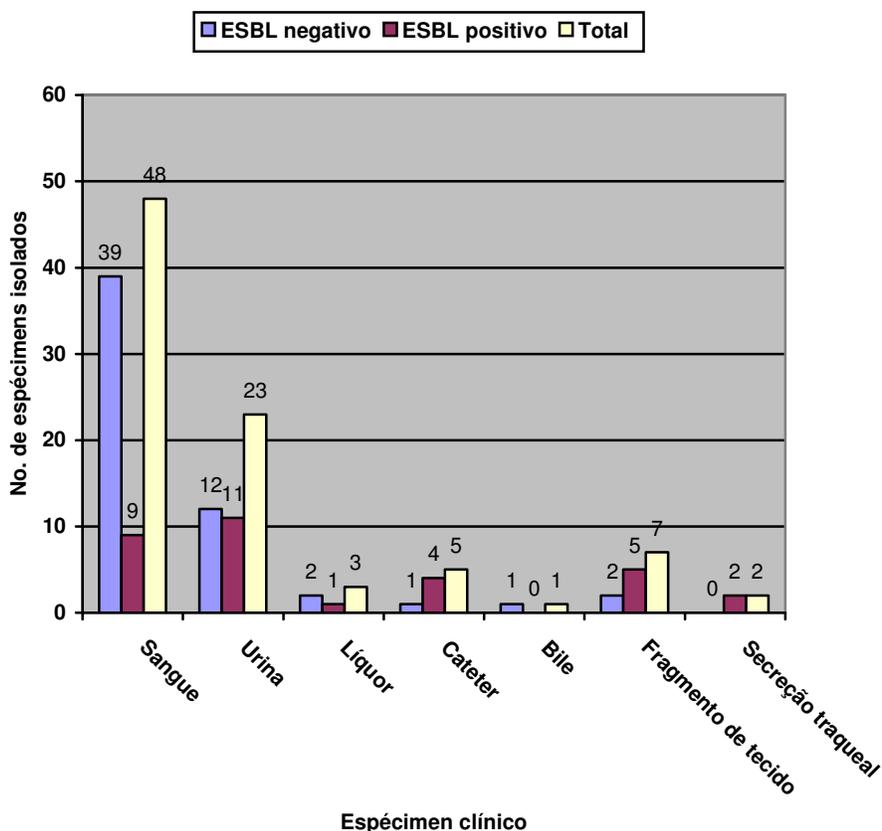
**FIGURA 1:** Detecção presuntiva da produção de ESBLs pelo método de aproximação de discos (sinergismo).  
 Legenda: Discos: centro, amoxicilina (20 µg) mais ácido clavulânico (10 µg); posição dos três discos da parte superior da placa, da esquerda para a direita: cefpodoxima (10µg), aztreonam (30 µg) e ceftriaxona (30 µg); posição dos dois discos da parte inferior da placa, da direita para a esquerda: cefotaxima (30 µg) e ceftazidima (30µg). (A) Cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBLs: deformação da borda da zona de inibição para todas as cinco drogas-substrato posicionadas a 25 mm do disco central contendo ácido clavulânico. (B) Cepa de *Klebsiella pneumoniae* não produtora de ESBLs: nenhuma distorção das zonas de inibição.



**FIGURA 2:** Teste confirmatório da produção de ESBLs.  
 Legenda: Quatro discos de antibióticos são dispostos ao redor do disco central de cefoxitina (30µg): *topo*, ceftazidima (30µg); *direita*, cefotaxima (30µg); *abaixo*, ceftazidima (30µg) mais ácido clavulânico (10µg); *esquerda*, cefotaxima (30µg) mais ácido clavulânico (10µg). Cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBLs: observe um aumento  $\geq 5$ mm na diferença dos valores da zona de inibição do disco contendo a combinação e do disco contendo a cefalosporina sozinha (cefotaxima/ácido clavulânico menos cefotaxima  $\geq 5$ mm ou ceftazidima/ácido clavulânico menos ceftazidima  $\geq 5$ mm).

## 6.2. Espécimens Clínicos

As cepas de *K. pneumoniae* foram obtidas de diferentes sítios anatômicos (Gráfico 1), sendo mais frequentemente isoladas de amostras sanguíneas e urinárias. Considerando o grupo de pacientes com infecção por cepas produtoras, o maior número de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs foi isolado de urina (11 pacientes; 12,4%), seguido de sangue (9 pacientes; 10,1%), fragmento de tecido (5 pacientes; 5,6%), cateter venoso central (4 pacientes, 4,5%), trato respiratório (2 pacientes; 2,3%) e líquido cefalorraquidiano (1 paciente; 1,1%) (Tabela 8). Infecção em corrente sanguínea foi observada mais frequentemente em pacientes com infecção por cepas não produtoras (39 pacientes; 43,8%) seguida de infecção urinária (12 pacientes; 13,5%) e infecção em ferida (2 pacientes; 2,3%). *K. pneumoniae* não produtores de ESBLs foram ainda isolados de líquido (1 paciente; 1,1%) e bile (1 paciente; 1,1%).



**Gráfico 1:** Número de espécimens clínicos dos quais foram isoladas cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

**Tabela 8:** Frequência de isolamento de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e espécimens clínicos.

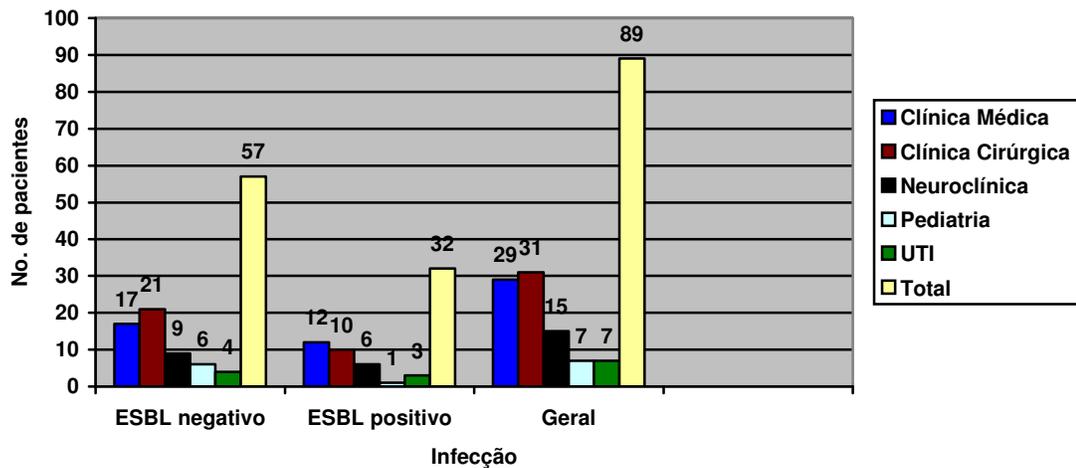
Espécimen clínico	Número de cepas produtoras de ESBLs	
	<i>K. pneumoniae</i>	
	Positivos (No. total)	Percentagem de positividade
Sangue	9(48)	18,8
Urina	11(23)	47,8
Pele, tecidos moles	5(7)	71,4
Cateter	4(5)	80,0
Líquido cefalorraquidiano	1(3)	33,3
Trato respiratório	2(2)	100,0
Bile	0(1)	
Total	32(89)	36

### 6.3. Especialidades Médicas

Infecções nosocomiais por *K. pneumoniae* acometeram predominantemente pacientes de Clínica Cirúrgica (31 pacientes; 34,8%), Clínica Médica (29 pacientes; 32,6%), Neuroclínica (15 pacientes; 16,9%) e de forma igualitária, Pediatria e UTI (7 pacientes; 7,9%) (Gráfico 2).

Considerando as infecções por cepas produtoras de ESBLs observou-se maior acometimento de pacientes da Clínica Médica (12 pacientes; 13,5%), seguida por pacientes da Clínica Cirúrgica (10 pacientes; 11,2%), da Neuroclínica (6 pacientes; 6,7%), da UTI (3 pacientes; 3,4%) e Pediatria (1 paciente; 1,1%).

Com relação às cepas não produtoras, as especialidades médicas das quais foi observado maior número de infecção nosocomial foram: Clínica Cirúrgica (21 pacientes; 23,6%), Clínica Médica (17 pacientes; 19,1%), Neuroclínica (9 pacientes; 10,1%), Pediatria (6 pacientes; 6,7%) e UTI (4 pacientes; 4,5%).

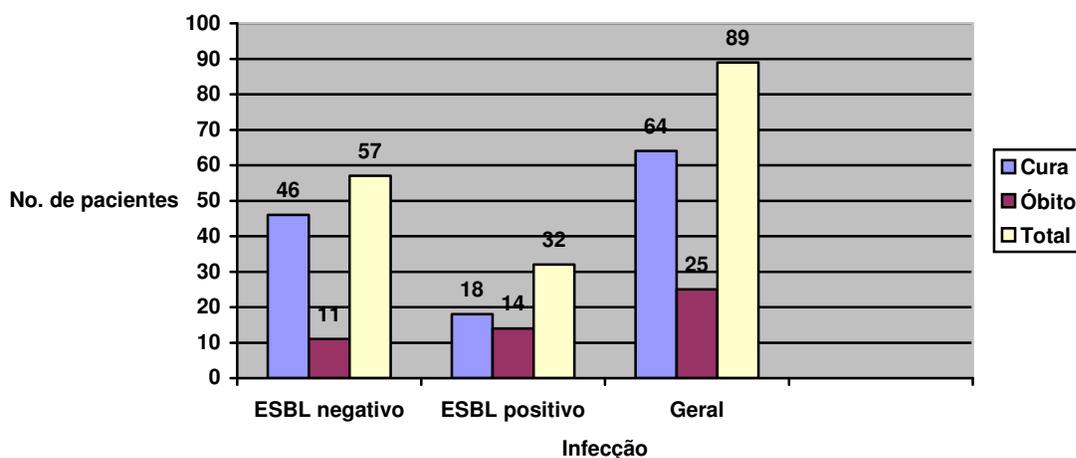


**Gráfico 2:** Número de pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* segundo as diferentes especialidades médicas.

#### 6.4. Evolução

Dos 89 pacientes com infecção nosocomial por *K. pneumoniae*, 64 (71,9%) obtiveram cura-clínica e 25 (28,1%) evoluíram a óbito (Gráfico 3). As 32 infecções por cepas produtoras de ESBLs acometeram 14 (43,8%) pacientes que evoluíram a óbito e 18 (56,3%) pacientes cuja evolução resultou em cura-clínica.

Por sua vez, considerando as restantes 57 infecções por cepas não produtoras, 46 (80,7%) pacientes obtiveram cura-clínica e 11 (19,3%) pacientes foram a óbito.

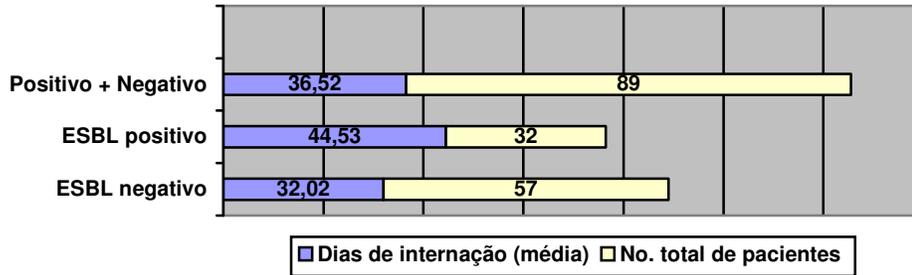


**Gráfico 3:** Evolução clínica dos pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae*.

As características demográficas e clínicas dos pacientes incluídos no presente trabalho encontram-se na Tabela 9. De maneira geral, o tempo médio de hospitalização desde a admissão até a saída foi de 36,5 dias ( $\pm 30,7$  dias; 4-173 dias) (Gráfico 8). Para os 32 pacientes com infecção por cepa produtora de ESBL o tempo médio foi de 44,53 ( $\pm 30,70$  dias; 12-134 dias) enquanto que para os 57 pacientes acometidos por cepa não produtora, o tempo médio foi de 32,02 ( $\pm 29,95$  dias; 4-173 dias) (Gráfico 4).

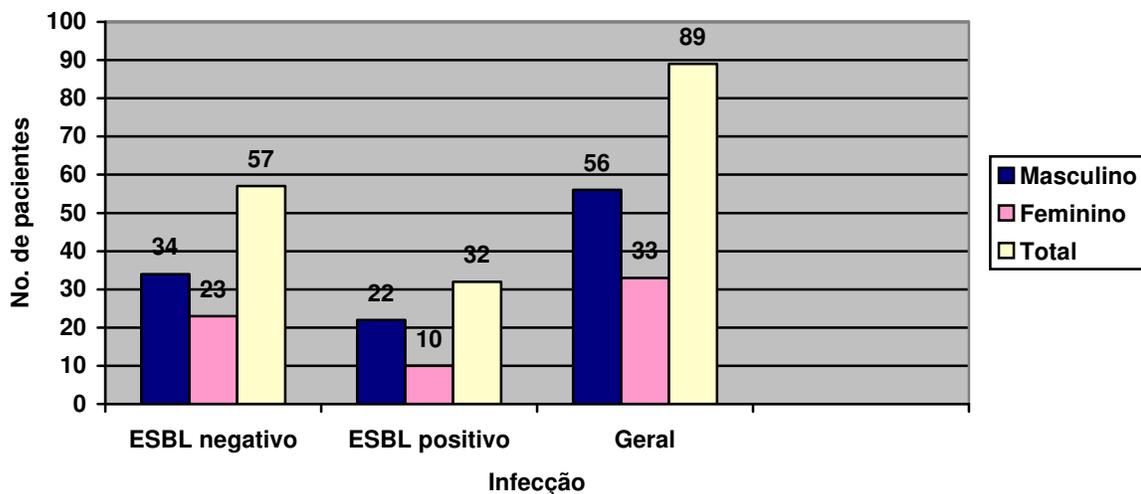
**Tabela 9:** Características demográficas gerais da população de estudo.

Característica	Valor
Idade em anos	
média $\pm$ DP.....	48,4 $\pm$ 23,2
mediana (intervalo).....	52 (0,1-86)
Gênero	
masculino (%).....	56 (63%)
feminino (%).....	33 (37%)
No. de pacientes com infecção por cepa de <i>K. pneumoniae</i> produtora de ESBLs.....	32 (36%)
Tempo de permanência hospitalar	
média de dias $\pm$ DP.....	36,5 $\pm$ 30,6
mediana (intervalo).....	24 (4-173)
Tempo de internação até a infecção	
média de dias $\pm$ DP.....	19,2 $\pm$ 22,2
mediana (intervalo).....	12 (2-157)
No. de antimicrobianos utilizados antes da infecção	
média $\pm$ DP.....	2,5 $\pm$ 1,7
mediana (intervalo).....	2 (0-7)
Tempo em uso de antimicrobianos	
média de dias $\pm$ DP.....	14,3 $\pm$ 18,3
mediana (intervalo).....	7,5 (1-120)
No. de pacientes em uso de sonda vesical de demora.....	65 (73%)
No. de pacientes com cateter venoso central inserido percutaneamente.....	59 (66,3%)
No. de pacientes em flebotomia.....	4 (4,5%)
No. de pacientes em uso de nutrição parenteral.....	17 (19,1%)
No. de pacientes submetidos à cirurgia.....	56 (63%)
No. de pacientes em traqueostomia.....	11 (12,3%)
No. de pacientes em ventilação mecânica.....	45 (50,5)
No. de pacientes com intubação nasogástrica.....	54 (60,7%)
No. de pacientes com dreno.....	25 (28,1%)
No. de pacientes em uso de hemoderivados.....	48 (53,9%)
No. de pacientes em uso de corticóide.....	31 (14,9%)

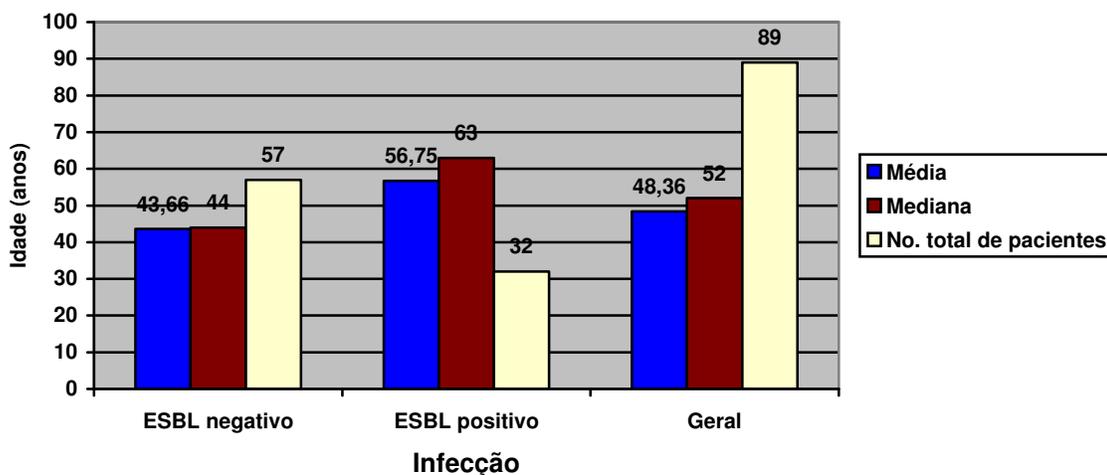


**Gráfico 4:** Tempo médio de internação (dias) de pacientes com infecção nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* ( $P$  valor = 0,4593).

Os pacientes com infecção por cepas produtoras de ESBLs eram, na sua maioria, do gênero masculino (22 masculino versus 10 feminino;  $P$  valor = 0,3937) - Gráfico 5 - e, em média, mais velhos do que os pacientes com infecção por cepa não produtora (56,75 anos versus 43,66 anos;  $P$  valor = 0,2019) (Gráfico 6).

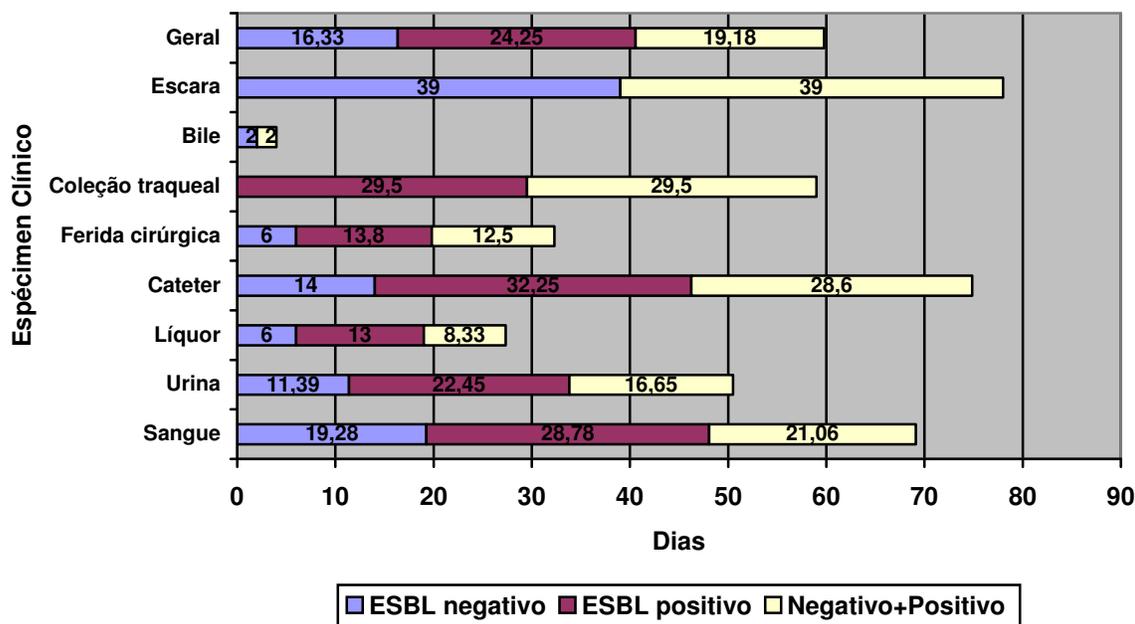


**Gráfico 5:** Distribuição dos pacientes com infecção nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* segundo o gênero.

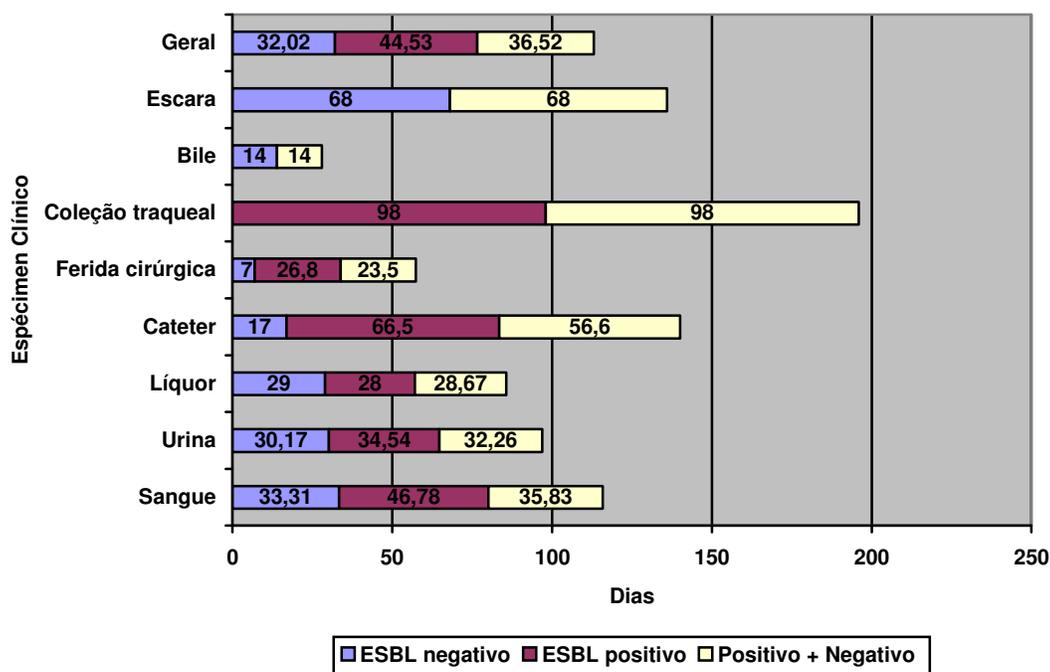


**Gráfico 6:** Distribuição dos pacientes com infecção nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* segundo a média e a mediana de idade.

O tempo-médio para infecção nosocomial, no grupo de pacientes com infecção por cepa produtora, foi de 24,3 dias, sendo de 16,3 dias para o grupo de pacientes com infecção por cepa não produtora ( $P$  valor = 0,4463) (Gráfico 7).

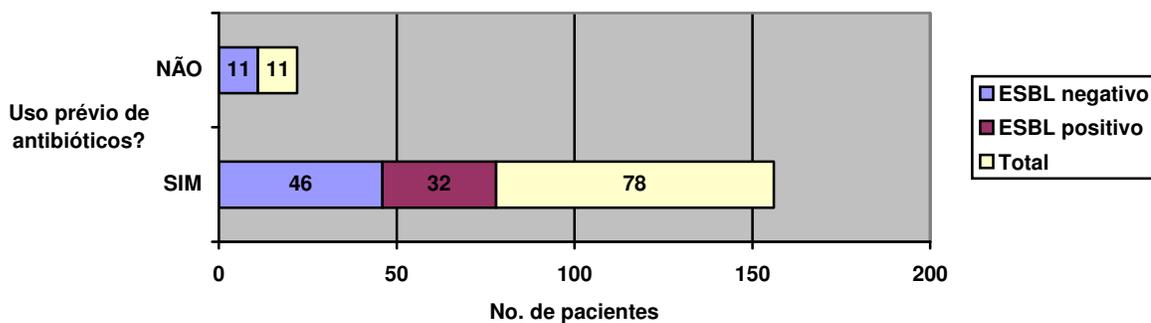


**Gráfico 7:** Tempo médio (dias) de internação até o diagnóstico de infecção nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* considerando os diversos espécimes clínicos.

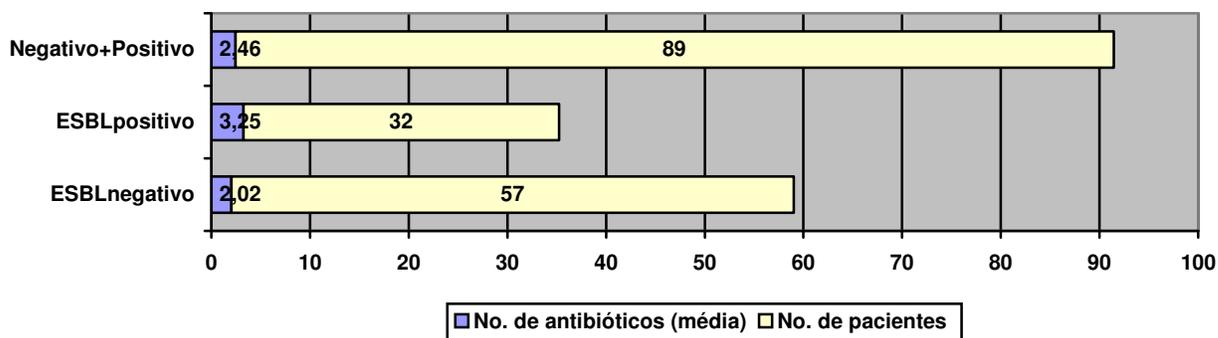


**Gráfico 8:** Tempo médio de permanência hospitalar (dias), considerando o sítio de infecção.

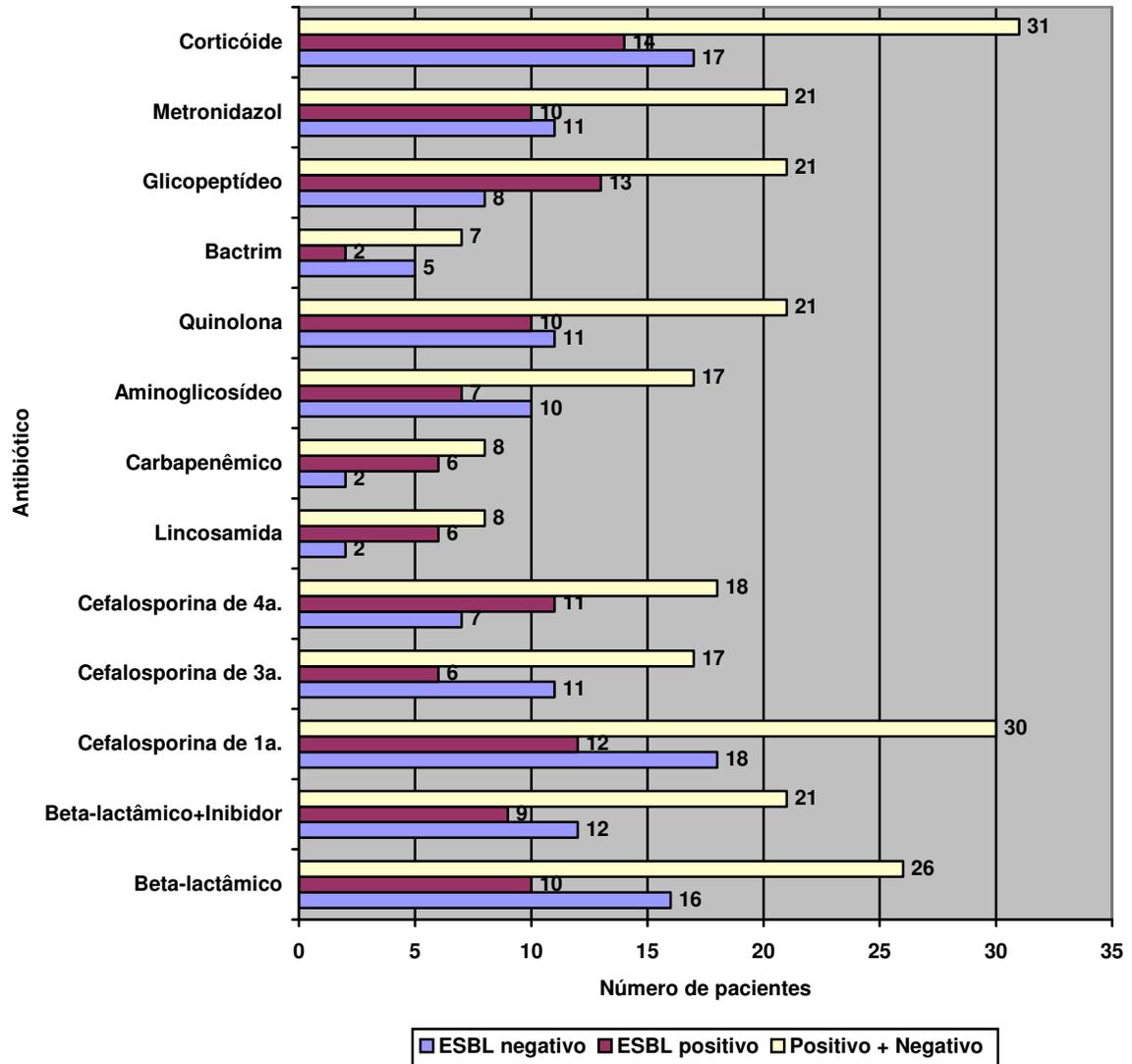
Setenta e oito (87,6%) pacientes tinham recebido previamente antibióticos antes da data de isolamento da cepa (Gráfico 9). Ainda, pacientes com infecção por cepa produtora de ESBLs foram mais expostos a antibióticos, seja em relação ao número total de antibióticos ( $P$  valor = 0,0017) (Gráfico 10), seja em relação à duração da antibioticoterapia ( $P$  valor = 0,0334). E finalmente, considerando ambos os grupos, pacientes com infecção por cepa produtora de ESBLs foram expostos, mais frequentemente, à cefalosporina de quarta geração (cefepime) ( $P$  valor 0,0162), lincosamida – clindamicina - ( $P$  valor = 0,0298), carbapenêmicos ( $P$  valor = 0,0298), e glicopeptídeos (vancomicina) ( $P$  valor = 0,063), (Gráfico 11), sendo expostos à lincosamida ( $P$  valor = 0,0405) e aos glicopeptídeos ( $P$  valor = 0,0586) por maior número de dias (Gráfico 12).



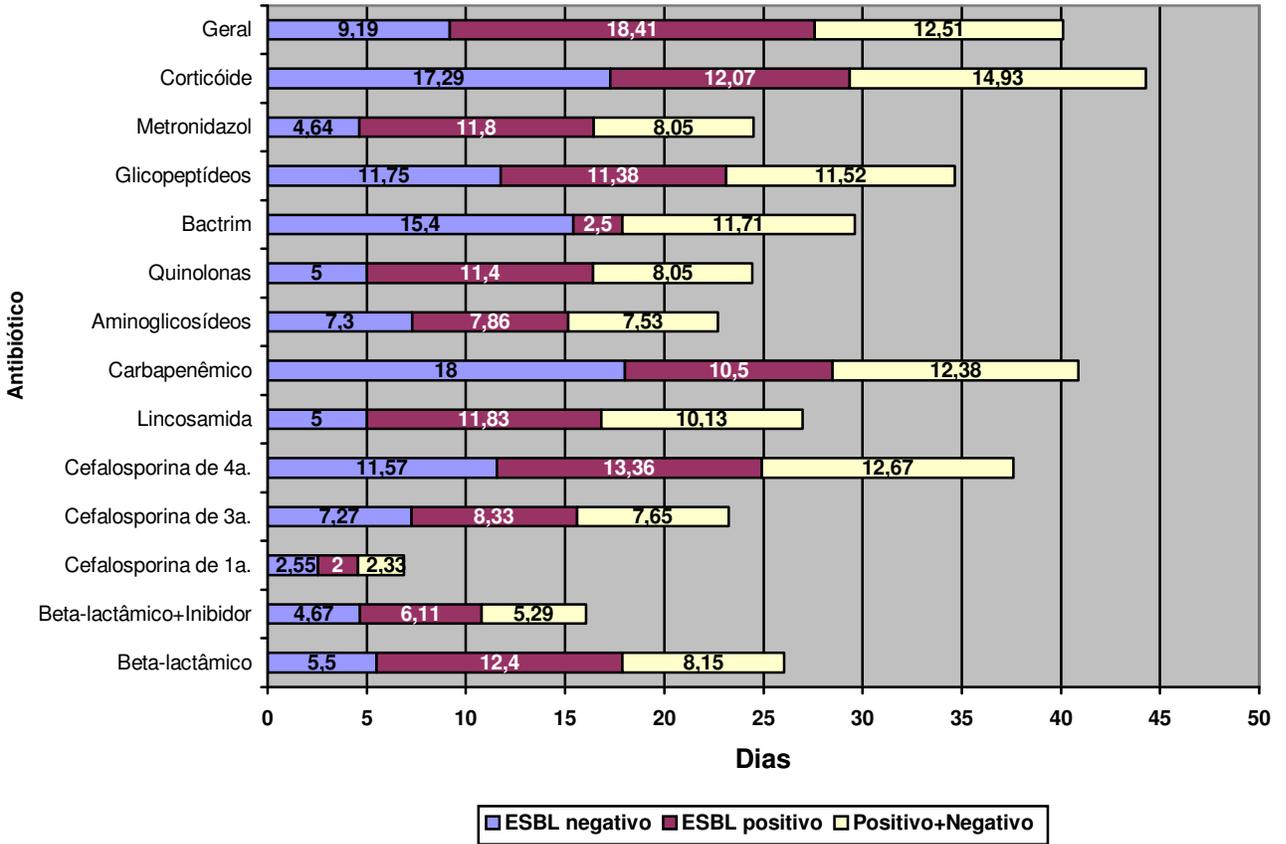
**Gráfico 9:** Uso prévio de antibióticos em pacientes com infecção nosocomial por *Klebsiella pneumoniae*.



**Gráfico 10:** Média do número de antibióticos consumidos previamente à infecção nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* ( $P$  valor = 0,0017).



**Gráfico 11:** Número de pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* sob antibioticoterapia prévia.



**Gráfico 12:** Média de dias em uso prévio de antibióticos.

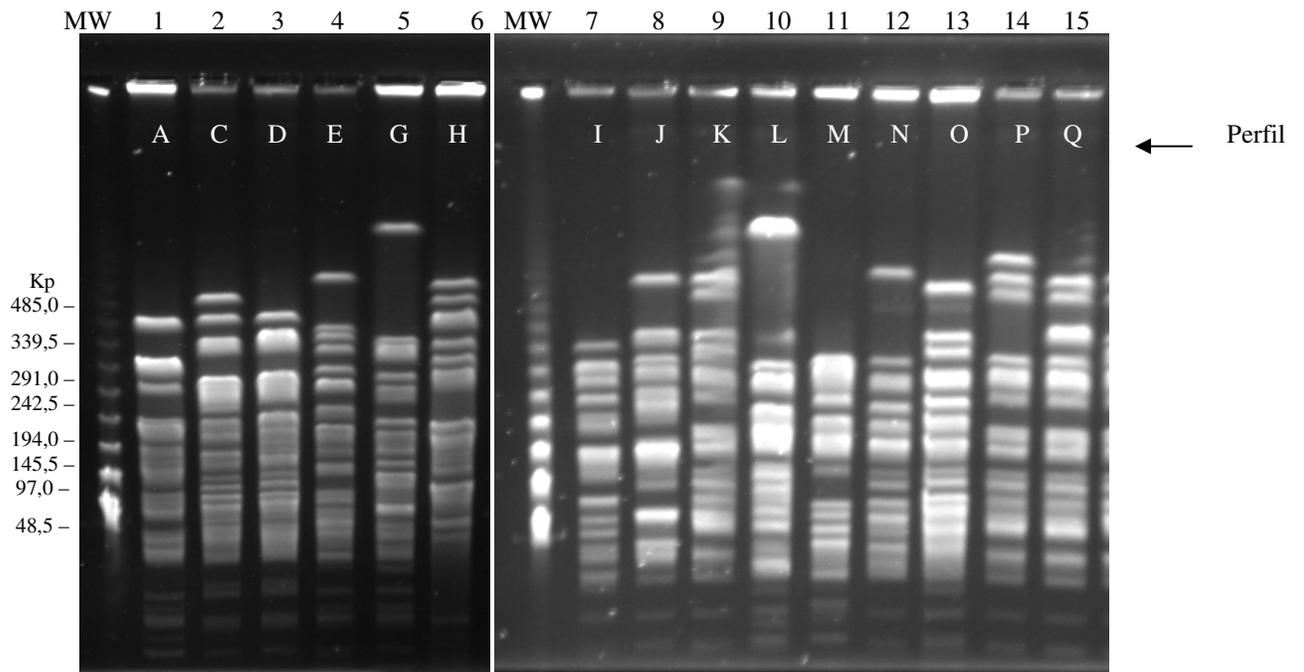
## 6.5. Análise do DNA Cromossômico por PFGE

Oitenta e nove cepas obtidas dos diversos espécimens clínicos de pacientes com infecção nosocomial por *K. pneumoniae* foram submetidas à PFGE. Os perfis obtidos forneceram diversos fragmentos de banda cujos tamanhos variaram de 20 a 500 kb, aproximadamente. Dentre as 32 cepas produtoras de ESBLs, foram identificados 15 perfis. Os padrões de restrição das cepas produtoras de ESBLs, conferidos pela ação da enzima de restrição SpeI, encontram-se reunidos na Figura 3.

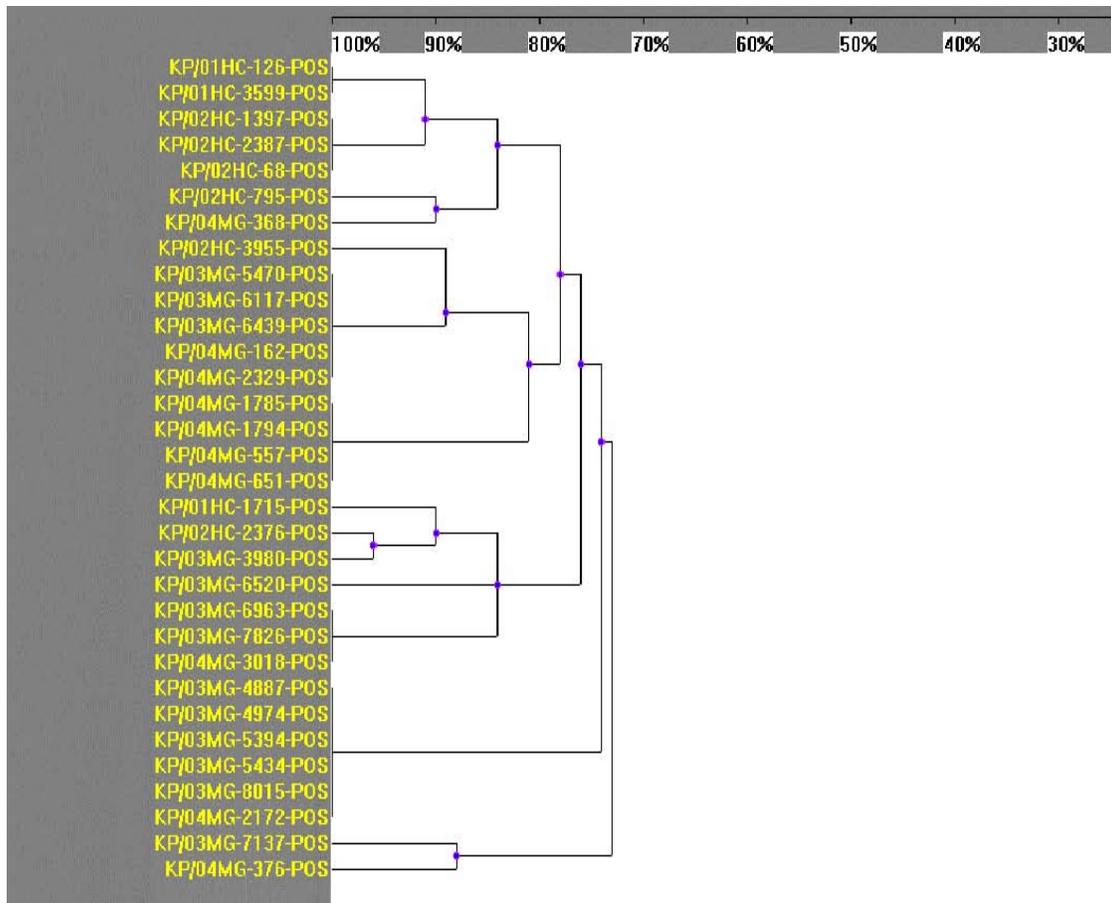
Para as cepas ESBLs-positivas, 6 foram classificadas no padrão mais expressivo (**perfil J**) representado por cepas isoladas no HMMG, no período de agosto de 2003 e abril de 2004, acometendo 3 pacientes da Clínica Cirúrgica, 2 pacientes da Clínica Médica (Ortopedia e Urologia) e 1 paciente da Neuroclínica. As outras cepas foram agrupadas segundo os seguintes padrões: **padrão K**, com 5 cepas HMMG, isoladas entre os meses de agosto de 2003 a abril de 2004 (1 paciente da Clínica Cirúrgica, 1 paciente da UTI-adulto, 3 pacientes da Clínica Médica); **padrão Q**, com 4 cepas de pacientes da Neuroclínica do HMMG, isoladas entre os meses de janeiro de 2004 a março de 2004; **padrão D**, com 3 cepas HC, isoladas entre janeiro de 2002 a abril de 2002 (2 pacientes da Clínica Médica e 1 paciente da Clínica Cirúrgica); **padrão M**, 3 cepas HMMG, isoladas entre os meses de outubro de 2003 a maio de 2004 (2 pacientes da Clínica Cirúrgica, 1 paciente da Neuroclínica); **padrão C**, com 2 cepas HC, isoladas entre os meses de junho e julho de 2001 (2 pacientes da UTI). Os demais 9 perfis compuseram padrões únicos, não relacionados entre si, classificados como padrões: **E, O, N, P, A, G, L, H, I** (Figura 4).

Considerando as 57 cepas não produtoras, foram obtidos 55 perfis. O perfil **AA** foi representado por duas cepas obtidas de um paciente da Pediatria-HC (09/02/2001) e outro da Nefrologia-HC (11/05/2001), o mesmo ocorrendo com o perfil **BB** que identificou cepas isoladas de dois pacientes da Enfermaria Geral-HC (27/02/2002 e 20/03/2002). As demais 53 cepas corresponderam a perfis de DNA cromossômico não relacionados entre si.

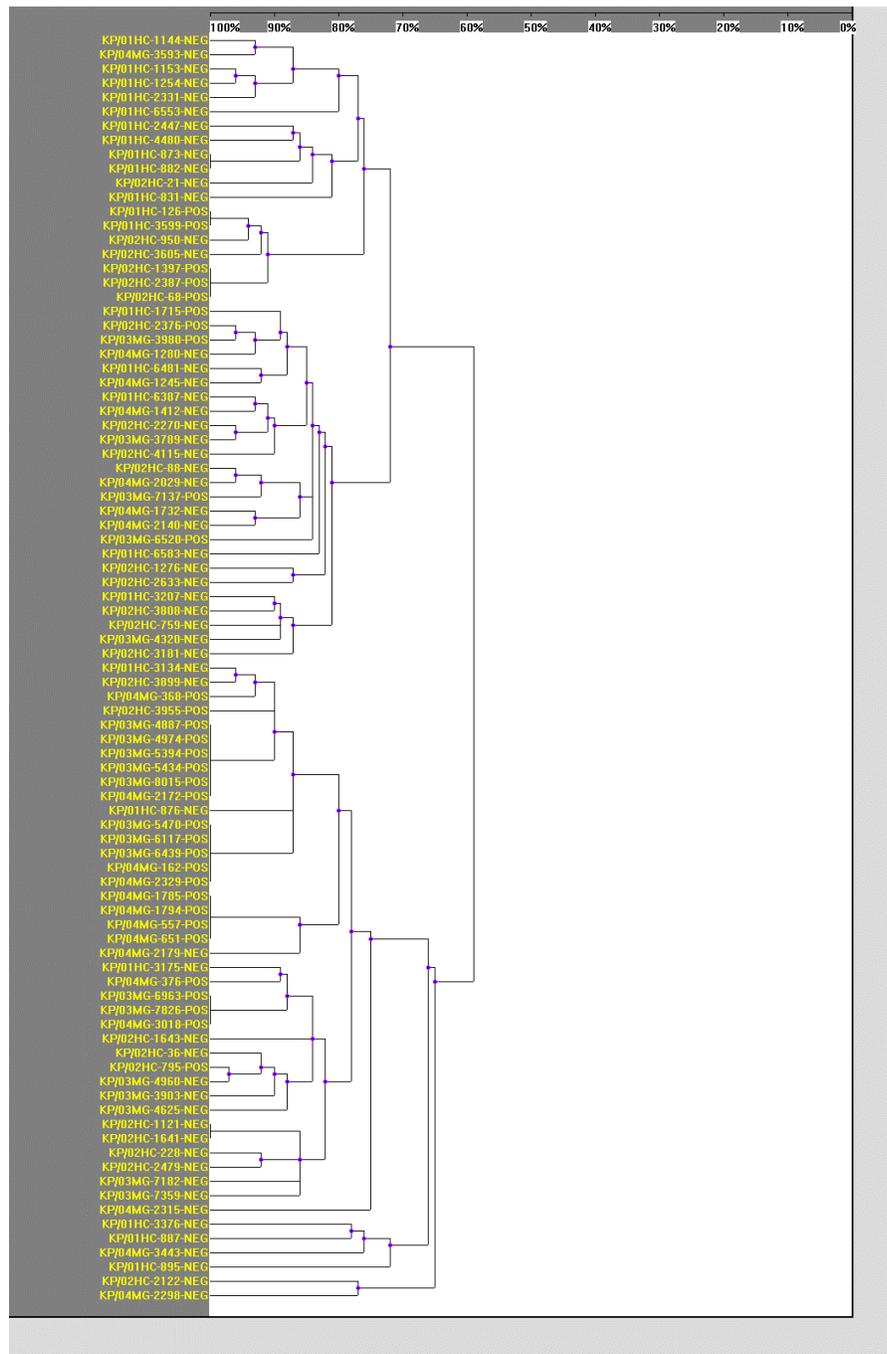
O dendrograma das 89 cepas do presente estudo encontra-se representado na Figura 5.



**FIGURA 3:** Diferentes perfis de DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsátil de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs após a digestão com SpeI. Legenda: MW, marcador de peso molecular *lambda ladder*.



**FIGURA 4:** Dendrograma das 32 cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) baseado nos resultados da eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e no coeficiente de similaridade de Dice. As cepas foram agrupadas segundo o método UPGMA (*unweighted-pair group method*) utilizando média aritmética. A escala indica a percentagem de similaridade genética.



**FIGURA 5:** Dendrograma das 89 cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* baseado nos resultados da eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e no coeficiente de similaridade de Dice. As cepas foram agrupadas segundo o método UPGMA (*unweighted-pair group method*) utilizando média aritmética. A escala indica a percentagem de similaridade genética.

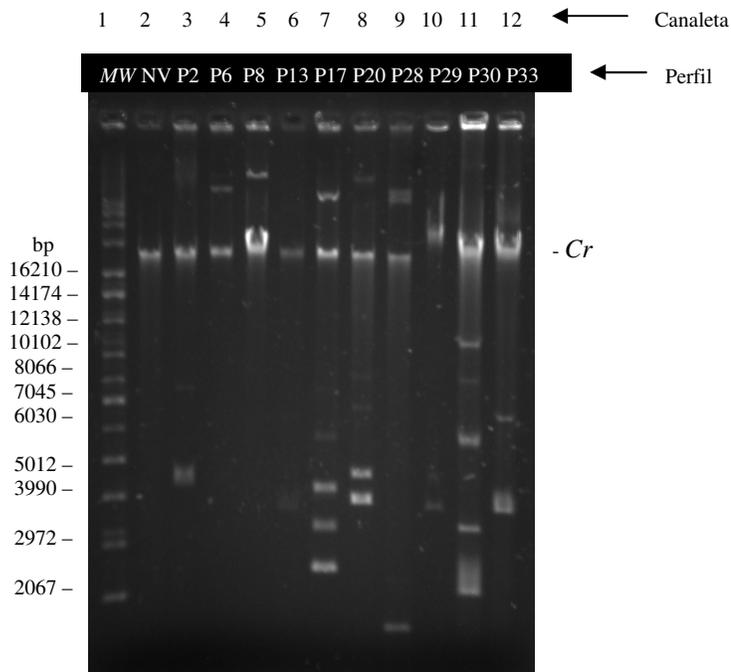
## 6.6. Análise do DNA Plasmidial

Em 24 (27%) cepas de *K. pneumoniae* - sendo 19 cepas não produtoras e 5 cepas produtoras de ESBL - não foi possível realizar a análise pelo fato de não ter sido detectado nenhum fragmento de DNA plasmidial, após a corrida eletroforética (perfil NV). Assim, dentre as restantes **27 cepas produtoras**, 10 perfis plasmidiais foram obtidos (Figura 6) - P2, P6, P8, P13, P17, P20, P28, P29, P30 e P33 - sendo o perfil **P28** aquele que agrupou o maior número de cepas, correspondentes a 5 pacientes do HMMG (4 da Clínica Cirúrgica e 1 da Ortopedia), cujas infecções ocorreram entre fevereiro de 2003 a abril de 2004. Em seguida, com 2 pacientes da Clínica Média-HMMG e 2 pacientes da Neuroclínica-HMMG, tivemos o perfil **P33**, cujas infecções ocorreram entre março de 2004 e abril de 2004. Os perfis P2, P6, P8, P13 e P30 classificaram, cada um, três pacientes. Por fim, com perfis totalmente diferente entre si e entre os demais, tivemos os perfis P17, P20 e P29, com apenas um paciente por perfil.

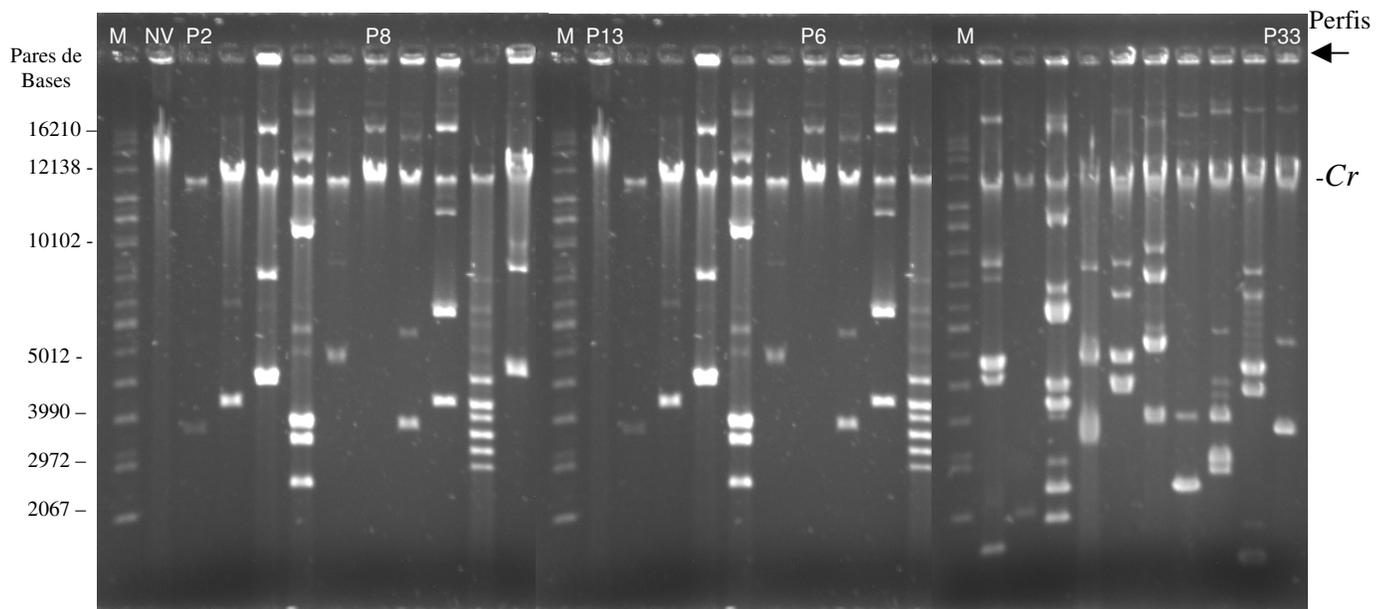
Dentre as **57 cepas não produtoras de ESBLs**, o método foi capaz de distinguir 32 (56,1%) perfis plasmidiais – Figura 7. Cinco perfis distintos, observados em cepas produtoras de ESBLs, foram observados em cepas não produtoras (P2, P6, P8, P13 e P33). O perfil P8 (4 pacientes) foi observado exclusivamente em cepas isoladas de pacientes hospitalizados no HC. Por sua vez, o perfil P33 (1 paciente), ocorreu restritamente em paciente hospitalizado no HMMG. Os demais perfis foram observados em cepas obtidas de ambos os hospitais (Tabela 10).

Algumas cepas com o mesmo perfil plasmidial tiveram perfis de DNA cromossômico não relacionados, revelados pela PFGE. De forma similar, algumas cepas com perfis idênticos, evidenciados pela PFGE, apresentaram diferentes perfis plasmidiais.

As duas técnicas de biologia molecular apresentaram concordância, quanto ao poder discriminatório, em 37(41,6%) cepas sendo capazes de esclarecer a relação genética de 16 (18%) cepas produtoras de ESBLs e de 21 (23,6%) cepas não produtoras (Tabela 11 e Tabela 12).



**FIGURA 6:** Dez diferentes perfis plasmidiais de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs obtidas de pacientes durante o período de estudo.  
 Legenda: *MW*, marcador de peso molecular (*supercoiled DNA ladder*; GibcoBRL, Gathersburg, MD); *Cr*, DNA cromossômico; *NV*, não visualizados plasmídios.



**FIGURA 7:** Diferentes perfis plasmidiais de cepas de *Klebsiella pneumoniae* não produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) obtidas de pacientes durante o período de estudo.  
 Legenda: *M*, marcador de peso molecular (*supercoiled DNA ladder*; GibcoBRL, Gathersburg, MD); *NV*, não visualizados plasmídios; *Cr*, DNA cromossômico. Perfis em destaque (P2, P8, P6, P13, P33): perfis observados também em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs.

**Tabela 10:** Perfis plasmidiais das 65 cepas de *Klebsiella pneumoniae* das quais foi possível a visualização de plasmídios.

Perfil	Nº da cepa	Procedência	Especialidade médica	Data do isolamento
P2	887	HC	Neuroclínica	09/02/2001
	5470	HMMG	Cirurgia Vascular	29/08/2003
	6117	HMMG	UTI-Adulto	25/09/2003
	7137	HMMG	Clínica Médica	07/11/2003
P3	873	HC	Pediatria	09/02/2001
P4	1153	HC	Traumatologia	23/02/2001
	3605	HC	Enfermaria Geral-Adulto	20/06/2002
P5	1254	HC	Gastrocirurgia	01/02/2001
P6	1715	HC	Enfermaria Geral-Adulto	27/03/2001
	228	HC	Neuroclínica	10/02/2002
	7182	HMMG	UTI-Adulto	10/11/2003
	6520	HMMG	Clínica cirúrgica	11/10/2003
	368	HMMG	UTI-Adulto	19/01/2004
P7	3593	HMMG	UTI-Adulto	03/06/2004
	1641	HC	Enfermaria Geral-Adulto	20/03/2002
P8	2447	HC	Gastrocirurgia	06/05/2001
	3175	HC	Pediatria	09/06/2001
	2387	HC	Ortopedia	24/02/2002
	1397	HC	Traumatologia	11/03/2002
	2479	HC	Pronto Socorro Adulto	28/04/2002
	2633	HC	Neuroclínica	06/05/2002
	3955	HC	Transplante de Medula Óssea	07/07/2002
P9	831	HC	Nefrologia	11/05/2001
P10	882	HC	Nefrologia	11/05/2001
P11	3207	HC	Pediatria	11/06/2001
P12	3376	HC	Pronto Socorro Adulto	20/06/2001
P13	651	HMMG	Neuroclínica	04/02/2002
	1643	HC	Gastrocirurgia	20/03/2002
	3808	HC	Traumatologia	28/06/2002
	376	HMMG	Clínica Médica	20/01/2004
P14	557	HMMG	Neuroclínica	30/01/2004
	6481	HC	Gastrocirurgia	28/01/2001
P15	6553	HC	Gastrocirurgia	03/12/2001
P16	21	HC	Gastrocirurgia	07/01/2002
P17	795	HC	Enfermaria Geral-Adulto	11/02/2002
P18	1121	HC	Enfermaria Geral-Adulto	27/02/2002
P19	1276	HC	Gastrocirurgia	06/03/2002
P20	2376	HC	Pediatria	24/04/2002
P22	3181	HC	Gastrocirurgia	05/06/2002
P23	3899	HC	Enfermaria Geral Adulto	03/07/2002
P24	4115	HC	Ortopedia	15/07/2002
P25	3789	HMMG	Pediatria	16/06/2003
P26	4320	HMMG	UTI-Adulto	12/07/2003
P27	4625	HMMG	Clínica Médica	25/07/2003
P28	4887	HMMG	Clínica Cirúrgica	05/08/2003
	4974	HMMG	Clínica Cirúrgica	08/08/2003
	5394	HMMG	Ortopedia	16/02/2003
	8015	HMMG	Cirurgia Vascular	05/04/2004
	2172	HMMG	Cirurgia Vascular	05/04/2004
P29	6439	HMMG	Ortopedia	08/10/2003
P30	6963	HMMG	Cirurgia Vascular	30/10/2003
	7826	HMMG	UTI-Adulto	08/12/2003
	3018	HMMG	Clínica Cirúrgica	07/05/2004
P31	1412	HMMG	UTI-Pediátrica	05/03/2004
P32	1732	HMMG	Pediatria	18/03/2004
P33	1794	HMMG	Neuroclínica	19/03/2004
	1785	HMMG	Neuroclínica	20/03/2004
	2315	HMMG	Clínica Cirúrgica	09/04/2004
	2329	HMMG	Clínica Médica	10/04/2004
	162	HMMG	Clínica Médica	21/04/2004
P34	2029	HMMG	UTI-Adulto	30/03/2004
P35	2140	HMMG	UTI-Pediátrica	04/04/2004
P36	2179	HMMG	Clínica Cirúrgica	05/04/2004
P37	2298	HMMG	UTI-Adulto	09/04/2004
P40	3443	HMMG	Pediatria	26/05/2004

Legenda: *HC*, Hospital de Clínicas/UNICAMP; *HMMG*, Hospital Municipal Dr. Mario Gatti; *em vermelho*, cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido.

**Tabela 11:** Sumário das cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido isoladas de pacientes com infecção nosocomial.

Isolado	Data	Espécimen clínico	Enfermaria ou departamento	Perfil da PFGE <sup>a</sup>	Perfil plasmidial
<i>K. pneumoniae</i>					
01HC-126	8 Junho 2001	Cateter	UTI	C	-
01HC-3599	1 Julho 2001	Sangue	UTI	C	-
02HC-68	31 Janeiro 2002	Cateter	Clínica Médica	D	-
02HC-1397	11 Março 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	D	P8
02HC-2387	24 Abril 2002	Sangue	Clínica Médica	D	P8
02HC-795	11 Fevereiro 2002	Sangue	Clínica médica	E	P17
04MG-368	19 Janeiro 2004	Cateter	Clínica Médica	O	P6
03MG-7137	7 Novembro 2003	Urina	Clínica Médica	N	P2
04MG-376	20 Janeiro 2004	Urina	Clínica Cirúrgica	P	P13
01HC-1715	27 Março 2001	Sangue	Clínica Médica	A	P6
02HC-2376	24 Abril 2002	Sangue	Pediatria	G	P20
03MG-3980	23 Junho 2003	Urina	Clínica Cirúrgica	I	-
03MG-6520	11 Outubro 2003	Urina	Clínica Cirúrgica	L	P6
02HC-3955	7 Julho 2002	Sangue	Clínica Médica	H	P8
03MG-6963	30 Outubro 2003	Urina	Clínica Cirúrgica	M	P30
03MG-7826	8 Dezembro 2003	Urina	Neuroclínica	M	P30
04MG-3018	7 Maio 2004	Fragmento de tecido	Clínica Cirúrgica	M	P30
03MG-4887	5 Agosto 2003	Ferida cirúrgica	Clínica Cirúrgica	J	P28
03MG-4974	8 Agosto 2003	Sangue	Clínica Cirúrgica	J	P28
03MG-5394	25 Agosto 2003	Ferida cirúrgica	Clínica Médica	J	P28
03MG-5434	27 Agosto 2003	Urina	Neuroclínica	J	-
03MG-8015	16 Dezembro 2003	Urina	Clínica Médica	J	P28
04MG-2172	5 Abril 2004	Fragmento de tecido	Clínica Cirúrgica	J	P28
04MG-557	30 Janeiro 2004	Líquor	Neuroclínica	Q	P13
04MG-651	4 Fevereiro 2004	Cateter	Neuroclínica	Q	P13
04MG-1794	19 Março 2004	Secreção traqueal	Neuroclínica	Q	P33
04MG-1785	20 Março 2004	Urina	Neuroclínica	Q	P33
03MG-5470	29 Agosto 2003	Urina	Clínica Cirúrgica	K	P2
03MG-6117	25 Setembro 2003	Urina	UTI	K	P2
03MG-6439	8 Outubro 2003	Fragmento de tecido	Clínica Médica	K	P29
04MG-2329	10 Abril 2004	Secreção traqueal	Clínica Médica	K	P33
04MG-162	21 Abril 2004	Sangue	Clínica Médica	K	P33

Legenda: -, plasmídeo não visualizado; *HC*, Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas; *MG*, Hospital Municipal Dr. Mario Gatti; *UTI*, unidade de terapia intensiva; *PFGE*, eletroforese em campo pulsátil;

<sup>a</sup> Isolados com perfis idênticos têm a mesma letra ou o mesmo número.

**Tabela 12:** Sumário das cepas de *Klebsiella pneumoniae* não produtoras de beta-lactamases de espectro estendido isoladas de pacientes com infecção nosocomial.

Isolado	Data	Espécimen clínico	Enfermaria ou departamento	Perfil da PFGE <sup>a</sup>	Perfil plasmidial
<i>K. pneumoniae</i>					
01HC-887	9 Fevereiro 2001	Sangue	Neuroclínica	AC	P2
01HC-873	9 Fevereiro 2001	Sangue	Pediatria	AA	P3
01HC-882	11 Maio 2001	Urina	Clínica Médica	AA	P10
01HC-876	9 Fevereiro 2001	Sangue	Clínica Médica	AD	-
01HC-895	10 Fevereiro 2001	Sangue	Clínica Médica	AE	-
01HC-1153	23 Fevereiro 2001	Sangue	Clínica Médica	AF	P4
01HC-1254	1 Março 2001	Sangue	Clínica Cirúrgica	AG	P5
01HC-1144	18 Abril 2001	Urina	Clínica Médica	AH	-
01HC-2331	29 Abril 2001	Sangue	Clínica Cirúrgica	AI	-
01HC-2447	6 Maio 2001	Sangue	Clínica Cirúrgica	AJ	P8
01HC-831	11 Maio 2001	Urina	Clínica Médica	AK	P9
01HC-3134	7 Junho 2001	Sangue	Clínica Médica	AL	-
01HC-3175	9 Junho 2001	Sangue	UTI	AM	P8
01HC-3207	11 Junho 2001	Sangue	Pediatria	AN	P11
01HC-3376	20 Junho 2001	Sangue	Neuroclínica	AO	P12
01HC-4480	18 Agosto 2001	Sangue	UTI	AP	-
01HC-6387	23 Novembro 2001	Sangue	Clínica Cirúrgica	AQ	-
01HC-6481	28 Novembro 2001	Sangue	Clínica Cirúrgica	AR	P14
01HC-6553	3 Dezembro 2001	Sangue	Clínica Cirúrgica	AS	P15
01HC-6583	6 Dezembro 2001	Sangue	Neuroclínica	AT	-
02HC-21	7 Janeiro 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	AU	P16
02HC-88	10 Janeiro 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	AV	-
02HC-752/2	10 Fevereiro 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	AX	-
02HC-228	10 Fevereiro 2002	Líquor	Neuroclínica	AZ	P6
02HC-950	19 Fevereiro 2002	Sangue	Clínica Médica	BA	-
02HC-1121	27 Fevereiro 2002	Sangue	Clínica Médica	BB	P18
02HC-1641	20 Março 2002	Sangue	Clínica Médica	BB	P7
02HC-1276	6 Março 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	BC	P19
02HC-1643	20 Março 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	BD	P13
02HC-2122	11 Abril 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	BE	-
02HC-2270	18 Abril 2002	Sangue	Neuroclínica	BF	-
02HC-2479	28 Abril 2002	Sangue	Clínica Médica	BG	P8
02HC-2633	6 Maio 2002	Sangue	Neuroclínica	BH	P8
02HC-3181	5 Junho 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	BI	P22
02HC-36	19 Junho 2002	Cateter	Clínica Cirúrgica	BJ	-
02HC-3605	20 Junho 2002	Sangue	Clínica Médica	BK	P4
02HC-3808	28 Junho 2002	Sangue	Clínica Cirúrgica	BL	P13
02HC-3899	3 Julho 2002	Sangue	Clínica Médica	BM	P23
02HC-4115	15 Julho 2002	Sangue	Clínica Médica	BN	P24
03MG-3789	16 Junho 2003	Urina	UTI	BO	P25
03MG-3903	23 Junho 2003	Urina	Clínica Médica	BP	-
03MG-4320	12 Julho 2003	Urina	Neuroclínica	BQ	P26
03MG-4625	25 Julho 2003	Sangue	Clínica Cirúrgica	BR	P27
03MG-4960	7 Agosto 2003	Bile	Clínica Cirúrgica	BS	-
03MG-7182	10 Novembro 2003	Fragmento de tecido	UTI	BT	P6
03MG-7359	17 Novembro 2003	Sangue	Clínica Cirúrgica	BU	-
04MG-1245	28 Fevereiro 2004	Urina	Clínica Médica	BV	-
04MG-1280	29 Fevereiro 2004	Sangue	Clínica Médica	BX	-
04MG-1412	5 Março 2004	Sangue	Pediatria	BZ	P31
04MG-1732	18 Março 2004	Urina	Pediatria	CA	P32

04MG-2029	30 Março 2004	Urina	Neuroclínica	CB	P34
04MG-2140	4 Abril 2004	Urina	Pediatria	CC	P35
04MG-2179	5 Abril 2004	Ferida cirúrgica	Clínica Cirúrgica	CD	P36
04MG-2298	9 Abril 2004	Urina	Neuroclínica	CE	P37
04MG-2315	9 Abril 2004	Sangue	Clínica Cirúrgica	CF	P33
04MG-3443	26 Maio 2004	Urina	Pediatria	CG	P40
04MG-3593	3 Junho 2004	Líquor	Clínica Médica	CH	P6

Legenda: -, plasmídeo não visualizado; *HC*, Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas; *MG*, Hospital Municipal Dr. Mario Gatti; *UTI*, unidade de terapia intensiva; *PFGE*, eletroforese em campo pulsátil;

<sup>a</sup> Isolados com perfis idênticos têm as mesmas letras ou o mesmo número.

## 6.7. Fatores de Risco

As variáveis associadas à infecção por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs, pela análise univariada (Tabelas 13, 14 e 15), foram:

- uso de : cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração, lincosamida (clindamicina), carbapenêmicos e glicopeptídeos; cirurgia; traqueostomia; menor idade; dias em uso de: lincosamida, glicopeptídeos; número total de antibióticos; duração da terapia antimicrobiana;

**Tabela 13:** Característica dos pacientes com infecção por cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs.

Variável	Pacientes ESBL-positivos (n=32)	Pacientes ESBL-negativos (n=57)	OR (95% IC)	P valor
Idade média em anos, (intervalo)	56,75 (0,08-82)	43,66 (0,17-86)	1,028 (1,006-1,051)	<b>0,0134</b>
Gênero				
Masculino	22 (68,8%)	34 (59,7%)	1,488 (0,596-3,719)	0,3949
Feminino	10 (31,2%)	23 (40,4%)		
Presença de cateter				
Venoso central	25 (78,1%)	34 (59,7%)	2,416 (0,897-6,510)	0,0811
Urinário	25 (78,1%)	40 (70,2%)	1,518 (0,552-4,176)	0,4191
Ventilação mecânica	17 (53,1%)	28 (49,1%)	1,174 (0,493-2,793)	0,7172
Cirurgia	26 (81,3%)	30 (52,6%)	3,900 (1,394-10,910)	<b>0,0095</b>
Nutrição parenteral	6 (18,8%)	11 (19,3%)	0,965 (0,320-2,914)	0,9498
Intubação nasogástrica	22 (68,8%)	32 (56,1%)	1,719 (0,690-4,280)	0,2447
Traqueostomia	8 (25,0%)	3 (5,3%)	5,998 (1,463-24,597)	<b>0,0128</b>
Flebotomia	1 (3,1%)	3 (5,3%)	0,581 (0,058-5,827)	0,6443
Drenos	12 (37,5%)	13 (22,8%)	2,031 (0,788-5,230)	0,1422
Transfusão de hemoderivados	19 (59,4%)	29 (50,9%)	1,411 (0,588-3,388)	0,4410
Corticóides	14 (43,9%)	17 (29,8%)	0,546 (0,222-1,344)	0,1881
Duração média em dias de terapia antimicrobiana ( $\pm$ DP)	18,4 ( $\pm$ 15,44)	9,2 ( $\pm$ 18,29)	1,033 (1,033-1,065)	<b>0,0334</b>
N <sup>o</sup> médio de antimicrobianos administrados até 48 horas antes do isolamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ( $\pm$ DP)	3,3 ( $\pm$ 1,52)	2,0 ( $\pm$ 1,62)	1,600 (1,194-2,145)	<b>0,0017</b>

ESBL,  $\beta$ -lactamases de espectro estendido;

DP = desvio padrão; 95% IC = 95% intervalo de confiança; OR = odds ratio;

**Tabela 14:** Análise univariada do número de pacientes recebendo terapia antimicrobiana antes da data do primeiro isolamento de *Klebsiella pneumoniae* do espécimen clínico.

Antibiótico	Número de pacientes			OR (95%IC)	P valor
	ESBL-positivo (n=32)	ESBL-negativo (n=57)	Total (%) (n=89)		
Penicilina	10	16	26 (29,2%)	0,859 (0,334-2,208)	0,7517
β-lactâmico com inibidor de β-lactamase	9	12	21 (23,6%)	0,681 (0,251-1,852)	0,4521
Cefalosporina de 1 <sup>a</sup> geração	12	18	30 (33,7%)	0,769 (0,310-1,907)	0,5711
Cefalosporina de 3 <sup>a</sup> geração	6	11	17 (19,1%)	1,036 (0,343-3,128)	0,9498
Cefalosporina de 4 <sup>a</sup> geração	11	7	18 (20,2%)	0,267 (0,091-0,784)	<b>0,0162</b>
Lincosamida	6	2	8 (9,0%)	0,158 (0,030-0,835)	<b>0,0298</b>
Carbapenêmico	6	2	8 (9,0%)	0,158 (0,030-0,835)	<b>0,0298</b>
Aminoglicosídeo	7	10	17 (19,1%)	0,760 (0,258-2,240)	0,6185
Sulfametoxazol mais trimetoprima	2	5	7 (7,9%)	1,442 (0,263-7,897)	0,6729
Quinolona	10	11	21 (23,6%)	0,526 (0,194-1,424)	0,2061
Glicopeptídeo	13	8	21 (23,6%)	0,239 (0,085-0,667)	<b>0,0063</b>
Metronidazol	10	11	21(23,6%)	0,526 (0,194-1,424)	0,2061
Corticóide	14	17	31(34,8%)	0,546 (0,222-1,344)	0,1881

ESBLs, β-lactamases de espectro estendido.

DP = desvio padrão;

OR = odds ratio; IC<sub>95%</sub> = intervalo de confiança.

**Tabela 15:** Análise univariada do número de dias sob terapia antimicrobiana anterior à data de isolamento primário de *Klebsiella pneumoniae* da amostra clínica.

Antibiótico	No. de dias sob terapia antimicrobiana			P valor
	ESBL-positivo Média ( $\pm$ DP)	ESBL-negativo Média ( $\pm$ DP)	OR (95%CI)	
Penicilinas	12,4 (16,8)	5,5 (4,6)	1,051 (0,976-1,133)	0,1876
$\beta$ -lactâmico+ inibidor de $\beta$ -lactamase	6,1(3,9)	4,7 (5,8)	1,068 (0,938-1,216)	0,3204
Cefalosporina de 1 <sup>a</sup> geração	2,0 (1,7)	2,6 (3,3)	0,986 (0,788-1,243)	0,9263
Cefalosporina de 3 <sup>a</sup> geração	8,3 (6,2)	7,3 (11,2)	1,006 (0,925-1,095)	0,8839
Cefalosporina de 4 <sup>a</sup> geração	13,4 (9,1)	11,6 (15,1)	1,067 (0,995-1,144)	0,0705
Lincosamida	11,8 (6,2)	5,0 (5,7)	1,283 (1,011-1,629)	<b>0,0405</b>
Carbapenêmico	10,5 (7,2)	18,0 (7,1)	1,079 (0,968-1,204)	0,1697
Aminoglicosídeo	7,9 (4,6)	7,3 (6,6)	1,029 (0,922-1,149)	0,6064
Sulfametoxazol+Trimetoprima	2,5 (0,7)	15,4 (17,4)	0,864 (0,610-1,222)	0,4084
Quinolona	11,4 (14,9)	5,0 (6,0)	1,093 (0,972-1,228)	0,1380
Glicopeptídeo	11,4 (6,5)	11,8 (8,5)	1,073 (0,997-1,155)	<b>0,0586</b>

ESBL,  $\beta$ -lactamase de espectro estendido;

DP = desvio padrão;

OR = *odds ratio*; IC<sub>95%</sub> = intervalo de confiança.

No entanto, pela análise multivariada, utilizando um modelo de regressão logística que incluía todas as variáveis associadas à infecção por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs identificadas pela análise univariada ( $P < 0,05$ ), a única variável que permaneceu como fator de risco independente para infecção por cepa produtora de ESBLs foi número total de antibióticos (OR, 1,60; IC<sub>95%</sub>, 1,194 – 2,145;  $P = 0,0017$ ). Considerando sua exclusão, os seguintes fatores de risco aparecem como fatores de risco independentes:

- cirurgia (OR, 4,9; IC<sub>95%</sub>, 1,451 – 16,615;  $P = 0,0105$ );
  - uso de glicopeptídeos (OR, 3,8; IC<sub>95%</sub>, 1,210 – 11,609;  $P = 0,0220$ );
  - dias em uso de lincosamida (OR, 1,4; IC<sub>95%</sub>, 1,054 – 1,803;  $P = 0,0191$ )
- (Tabela 16).

**Tabela 16:** Resultado da análise multivariada usando modelo de regressão logística do tipo *stepwise* para a identificação de \*fatores de risco independentes para a aquisição de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs.

<b>Variável</b>	<b>OR</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>	<b>P valor</b>
Cirurgia	4,910	1,415-16,615	0,0105
Dias em uso de lincosamida	1,378	1,054-1,803	0,0191
Uso de glicopeptídeos	3,749	1,210-11,609	0,0220

ESBL, beta-lactamase de espectro estendido;

OR = *odds ratio*; IC<sub>95%</sub> = intervalo de confiança

\* somente os fatores de risco estatisticamente significantes estão descritos nesta tabela.

## ***7. DISCUSSÃO***

No presente estudo, a produção de ESBLs foi constatada em 32 (36%) cepas de *K. pneumoniae*. Apesar dos índices de positividade variarem significativamente de região para região ou mesmo de hospital para hospital, dentro da mesma área geográfica, os índices brasileiros são muito maiores do que aqueles observados na maioria das outras partes do mundo (Tabelas 3 e 4). Até agora, nenhuma informação significativa sobre a prevalência de cepas produtoras de ESBLs no Brasil foi publicada, exceto por um número limitado de trabalhos envolvendo alguns centros ou cidades, o que não reflete completamente a distribuição real das ESBLs no Brasil (Marra *et al.*, 2006b). No entanto, são destes resultados que provem o conhecimento nacional sobre a situação das ESBLs. Ainda, os estudos brasileiros disponíveis não abordam a importância da especificidade enzimática aos diferentes substratos recomendados pela literatura.

Em nossos dados, os espécimens clínicos dos quais foram isoladas mais cepas produtoras de ESBLs foram: urina (12,4%) e sangue (10,1%) sendo observada a produção de ESBLs em 22 pacientes do gênero masculino e 10 pacientes do gênero feminino ( $P$  valor = 0,3937). O gênero *Klebsiella* representa de 6 a 17% de todas as infecções do trato urinário e apresenta uma incidência ainda mais elevada em grupos específicos de pacientes, como os de neuropatias de bexiga ou pacientes diabéticos (Podschung e Ullmann, 1998). A detecção da produção de ESBLs em microrganismos obtidos de urina torna-se importante, considerando o potencial de transferência de tais bactérias a outros pacientes (Mendelson *et al.*, 2005; Paterson e Bonomo, 2005).

De acordo com o trabalho multicêntrico de Sader *et al.*, (1999a), referente ao programa SENTRY de monitoramento das infecções nosocomiais e comunitárias, do qual participaram países como Brasil (Rio de Janeiro, Florianópolis, São Paulo), seis países da América Latina, EUA, Canadá, países do Oriente Médio, África do Sul e Austrália, por um período de 3 a 5 anos no qual houve a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de 1241 patógenos causadores de infecção em corrente sanguínea, pneumonia, infecção em ferida e trato urinário, *Klebsiella* spp constituiu o quarto microrganismo mais isolado (109; 9,9%), responsável por 11,7% das infecções urinárias, 11% das infecções respiratórias, 9,7% das infecções em corrente sanguínea e 7% das infecções de pele e de tecidos moles. Ainda, considerando os mais expressivos sítios de infecção, a percentagem de cepas de *Klebsiella* suspeitas de serem produtoras de ESBLs foi de 60% e de 54,9% e 56,6% para pele-tecidos

moles e infecção em corrente sanguínea, respectivamente. Daoud e Hakime (2003), estudando a prevalência e os padrões de suscetibilidade de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBLs em um hospital universitário de Beirute (Líbano) observaram taxas mais expressivas de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs em amostras urinárias (46,25%; 154 de 333). Jeong *et al.*, (2004a), investigando as ESBLs produzidas por *K. pneumoniae* e *E. coli* na Coréia, constataram que urina e escarro constituíam as fontes mais importantes de disseminação de tais cepas, superando as amostras sanguíneas.

Gales *et al.*, (2002a), participando do programa SENTRY para o estudo da frequência de uropatógenos obtidos de pacientes da América Latina entre os anos de 1997 a 2000, do qual fez parte o Brasil, representado pelas cidades de São Paulo, Rio de Janeiro, Florianópolis e Porto Alegre, relatam que dos 1961 isolados bacterianos urinários obtidos de pacientes hospitalizados (ou de pacientes não hospitalizados, mas com história recente de internação para tratamento de infecção do trato urinário) o gênero *Klebsiella* constituiu o segundo microrganismo mais isolado, sendo 30% a percentagem de cepas produtoras de ESBLs. De forma geral, segundo os autores, a idade média de pacientes com infecção urinária foi de 51,3 anos, e as infecções acometeram predominantemente o gênero feminino (65,5%).

No presente estudo, considerando os pacientes com infecção por *K. pneumoniae*, o tempo para infecção foi bastante variável, situando-se entre 2 a 157 dias após a admissão hospitalar. As idades dos pacientes variaram de 0,1 a 86 anos (média: 48,4 anos e mediana: 52 anos), sendo estatisticamente significativa as infecções por cepas produtoras de ESBLs em pacientes mais velhos ( $P$  valor = 0,0134). Na literatura, gênero masculino é identificado como fator de risco para a aquisição de bactérias produtoras de ESBLs, apesar dos mecanismos não estarem totalmente esclarecidos. Uma observação em estudos precedentes destaca que cepas produtoras de ESBLs na urina (infecção ou colonização) são mais frequentemente isoladas de pacientes hospitalizados por períodos prolongados, e com estado clínico mais debilitado, apresentando, na maioria das vezes, incontinência urinária ou intestinal. Seriam, portanto, mais expostos ao risco de infecção nosocomial cruzada, pela considerável manipulação recebida em decorrência da dependência dos cuidados diários, e assim, mais expostos a agentes antimicrobianos o que, por sua vez, os levariam à aquisição de microrganismos cada vez mais resistentes (Mendelson *et al.*, 2005).

A suscetibilidade a cefalosporinas de espectro estendido na presença de ácido clavulânico constitui característica fenotípica da resistência mediada por ESBLs, diferenciando-a da resistência mediada por AmpC-beta-lactamases. Vários métodos para a detecção da produção de ESBLs baseados nesta característica foram desenvolvidos, dentre eles: disco-aproximação (descrito por Jarlier e cols.), método de Jacoby e Han, discos-combinados® (Oxoid), teste tridimensional (descrito por Thomson e Sanders), os testes de triagem e confirmação propostos pelo CLSI, *Etest ESBL*® (AB Biodisk), vários sistemas automatizados, como Vitek® (Biomérieux), BD Phoenix® (Becton & Dickinson), Microscan® (Dade Behring), e os métodos moleculares, como a determinação do ponto isoelétrico, sondas de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR: *polymerase chain reaction*) para genes específicos da expressão de beta-lactamases, PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism analysis*), sondas de oligonucleotídeos (*oligotyping method*), detecção e identificação de derivados SHV, PCR-SSCP: caracterização de ESBLs do tipo SHV através da análise do polimorfismo da PCR (*PCR-strand conformational polymorphism analysis*), PCR-SSCP e PCR-RFLP, reação em cadeia da ligase (LCR: *ligase chain reaction*) para a identificação de genes SHV, sequenciamento de nucleotídeos (Winokur *et al.*, 2001; Bradford, 2001; Morris *et al.*, 2003). A detecção de ESBLs pode ser difícil e cada sistema apresenta falhas na identificação de certas ESBLs (Winokur, *et al.*, 2001). A importância destes testes fica comprometida pelo fato das ESBLs apresentarem afinidades diferentes a cada cefalosporina selecionada para os testes de triagem, pela presença de múltiplas beta-lactamases em um hospedeiro e por outros fatores do hospedeiro, como a presença de beta-lactamases cromossomais induzíveis da classe C (Preston *et al.*, 2003).

A detecção presuntiva e posterior confirmação da produção de ESBLs por métodos baseados nos efeitos inibitórios do ácido clavulânico não são geralmente recomendadas às enterobactérias possivelmente dotadas de beta-lactamases cromossomais induzíveis, devido ao potencial de indução do ácido clavulânico sobre a expressão de beta-lactamases cromossômicas, sendo o resultado final um balanço entre o efeito de indução e o efeito inibidor (Quinteros *et al.*, 2003). Enterobactérias produtoras de AmpC beta-lactamases e ESBLs têm sido relatadas crescentemente por todo o mundo, porém a expressão de elevados níveis de AmpC beta-lactamases pode mascarar o reconhecimento de cepas

produtoras de ESBLs (Pitout *et al.*, 2003). No presente estudo todas as cepas de *K. pneumoniae* resistentes à cefoxitina foram excluídas, como forma de diminuir a influência exercida por outros mecanismos de resistência que não o da produção de ESBLs do grupo 2be.

Do ponto de vista laboratorial, a reduzida suscetibilidade e a resistência às cefalosporinas de espectro estendido e/ou agentes monobactâmicos representam o primeiro indicativo da produção de ESBLs, mas ainda assim, tornam-se necessários os testes de confirmação da produção de ESBLs envolvendo o clavulanato e os beta-lactâmicos selecionados. A expressão de uma enzima ESBL nem sempre envolve um fenótipo que possa ser interpretado como resistente pela determinação da CIM ou pelos métodos de disco-difusão, propostos pelo CLSI (Spanu *et al.*, 2002). A escolha das drogas a serem testadas e a distância entre os discos variam de estudo para estudo, sendo reconhecido que a inadequada disposição dos discos acarreta sensibilidade limitada ao método, porém especificidade aceitável (Cormican, Marshall e Jones, 1996; Emery e Weymouth, 1997).

No presente trabalho, utilizamos a distância de 25 mm (centro a centro) entre o disco de amoxicilina-ácido clavulânico e os outros discos contendo o agente beta-lactâmico. Nosso trabalho não contou com nenhum método molecular para a detecção de cepas produtoras de ESBLs. Por conter uma abordagem laboratorial e outra clínica (destacando fatores de risco para infecção por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs), tivemos a preocupação em trabalhar com métodos mais simples, mais acessíveis à rotina de um laboratório hospitalar, de forma a gerar resultados que pudessem ser utilizados não somente dentro de um contexto de pesquisa, mas extensivo à realidade de muitos laboratórios e de muitos hospitais. Desta forma, preocupou-nos a utilização de PCR sem a efetuação da focalização isoelétrica: poderíamos incorrer no erro de subestimar genes de uma determinada família de ESBLs e não considerar outros de menor expressividade o que acarretaria na não inclusão de importantes pacientes para o estudo dos fatores de risco. Optamos, então por trabalhar com um método que nos permitisse identificar cepas produtoras de ESBLs de forma geral, não nos atendo a qualificar qual tipo de ESBLs envolvido, possibilitando-nos estabelecer um juízo, de acordo com os resultados dos diferentes substratos. Mesmo para as condições de corrida eletroforética, optamos por um protocolo de PFGE cujo tempo de corrida fosse mais curto (18 horas), imaginando que em

situações de surto, algumas poucas horas são de grande importância. A focalização isoeétrica é um método de separação eletroforética na qual proteínas se alinham como bandas visíveis em seus pontos isoeletricos (pI), utilizando um sistema com um gradiente de pH. A técnica pode ser utilizada para a separação de beta-lactamases, realizada em finas camadas de gel de poliacrilamida, com a visualização de bandas (enzimas) reveladas após a adição de substrato (cefalosporina) causando mudança na coloração, indicando que houve a degradação da cefalosporina pela enzima beta-lactamase. De acordo com o valor do pI pode-se sugerir qual família de ESBLs está presente e assim, realizar estudos moleculares do tipo PCR. Sem a focalização isoeétrica ficaríamos restritos a *primers* convencionais, incorrendo no risco de termos uma nova ESBL para a qual o *primer* não seria direcionado. Desta forma, optamos por uma abordagem mais panorâmica, porém não menos importante para o nosso estudo, garantindo uma visão mais abrangente da complexa dinâmica das ESBLs, estando menos sujeitos à adoção de medida tendenciosas.

Diferentes ESBLs hidrolisam cada cefalosporina em graus variados. Nossos dados foram analisados para ceftazidima, ceftriaxona, aztreonam, cefotaxima e cefpodoxima para avaliação do melhor substrato na identificação de produtores de ESBLs. Em vários países, ceftazidima detectou o maior número de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs (Winokur *et al.*, 2001). Por outro lado, Ho e cols., (2000) em seus trabalhos concluíram que ceftazidima, foi considerado o substrato que menos identificou o fenótipo de produção de ESBLs, em Hong Kong. Estudos conduzidos por Bell e cols., (2002) apresentam ceftriaxona como o melhor substrato na detecção de produtores de ESBLs dentre cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*. Em nosso trabalho, distorções características nas zonas de inibição, induzidas pela molécula de ácido clavulânico (indicativas de uma produção presuntiva de ESBLs) foram observadas em 96%, 62,5%, 50%, 18,8% e 12,5% das cepas ao redor dos discos contendo aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefpodoxima, respectivamente. Gangoué-Piéboji e cols., (2005) encontraram as distorções nas zonas de inibição em 97%, 90%, 86% e 62% das enterobactérias ao redor dos discos contendo aztreonam, ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima, respectivamente. O fenótipo de produtor de ESBLs foi mais frequentemente observado em bactérias do gênero *Klebsiella*.

No Brasil, Azevedo e cols., (2004), avaliando os testes fenotípicos (*Etest ESBL*®, disco-combinado, sensibilidade à cefoxitina) para a detecção de cepas de *E. coli* e

*Klebsiella* spp produtoras de ESBLs obtiveram o efeito inibitório do ácido clavulânico (disco-combinado) em 72 (67%) das 107 cepas tidas como prováveis produtoras de ESBLs pelo método da mensuração dos halos de inibição. O efeito inibitório foi obtido mais frequentemente em cepas de *K. pneumoniae* (75%), sendo a combinação cefotaxima – cefotaxima mais ácido clavulânico o melhor substrato confirmador. Se os autores tivessem utilizado somente o conjunto ceftazidima – ceftazidima mais ácido clavulânico, a confirmação seria efetuada somente em 32% de *E. coli*, 51% de *K. pneumoniae* e 14% de *K. oxytoca*. A utilização de cefotaxima – cefotaxima mais ácido clavulânico confirmou a seguinte proporção de produtores: 47,2% de *E. coli*, 61,7% de *K. pneumoniae* e 57,1% de *K. oxytoca*. Com a utilização concomitante dos dois substratos (ceftazidima e cefotaxima) foi possível a confirmação de 62,3% de *E. coli*, 74,5% de *K. pneumoniae* e 57,1% de *K. oxytoca*. Os resultados mostram que a confirmação da produção de ESBLs varia de acordo com o substrato utilizado (ceftazidima ou cefotaxima) e assim, nosso estudo traz importantes contribuições por utilizar vários substratos numa tentativa de avaliar qual o melhor substrato para a detecção e para a confirmação da produção de ESBLs em cepas de *K. pneumoniae* obtidas de dois hospitais da rede pública de saúde.

Como as cefalosporinas são também substrato para a hidrólise promovida por enzimas resultantes de expressão cromossomal ou derivadas de expressão cromossômica, a demonstração da inibição da hidrólise de um determinado substrato beta-lactâmico, promovida por um inibidor de beta-lactamase, permanece ainda necessária na constatação de que o microrganismo em teste é um produtor de enzima do grupo 2be, segundo a classificação de Bush (Cormican, Marshall e Jones, 1996). Nossos resultados apontam ceftazidima/ceftazidima-ácido clavulânico como a combinação de menor capacidade de detecção da produção de ESBLs, no teste confirmatório, considerando que não houve detecção da produção de ESBLs *in vitro* de duas cepas produtoras. Por outro lado, a combinação cefotaxima/cefotaxima-ácido clavulânico foi capaz de confirmar a produção nas 32 cepas selecionadas no teste de triagem. De acordo com os dados de Rahman e cols., (2004) a combinação de amoxicilina (20µg) e ácido clavulânico (10µg) com ceftriaxona foi a que apresentou melhor detecção, sendo *K. pneumoniae* o microrganismo mais frequentemente envolvido (31,6%). O uso da combinação de cefepime/cefepime-ácido clavulânico trouxe melhoras na detecção de espécies bacterianas (*E. coli*, *K. pneumoniae*,

*P. mirabilis*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *Providencia* spp) produtoras de ESBLs no estudo realizado por Quinteros e cols., (2003) da ordem de 93%, em comparação aos 60% e 53% obtidos com a combinação de ácido clavulânico mais cefotaxima e ceftazidima, respectivamente. Argumenta-se que cepas bacterianas produtoras de enzimas SHV e TEM apresentam mais atividade sobre ceftazidima do que sobre cefotaxima, enquanto que cepas produtoras de enzimas CTX-M são geralmente mais ativas contra cefotaxima e ceftriaxona do que ceftazidima (Daoud e Hakime, 2003; Edelstein *et al.*, 2003). Apesar do presente estudo não contemplar a identificação das ESBLs mais comumente envolvidas, é possível, considerando os dados obtidos, sugerir que o provável mecanismo de resistência tenha sido aquele mediado por enzimas da família CTX-M.

ESBLs são tipicamente codificadas por genes contidos em plasmídios de alto peso molecular da ordem de 80 kp a 300 kp, passíveis de troca entre espécies bacterianas. Em muitos casos, estes plasmídios carregam genes de resistência a outros agentes antimicrobianos (Rasheed *et al.*, 2000; Winokur *et al.*, 2001). Em situações de surto, a disseminação da resistência está relacionada a plasmídios auto-transferíveis ou à transposição de genes de resistência dentre diferentes plasmídios por outros elementos genéticos como transposons (Gouby *et al.*, 1994). Dez perfis plasmidiais (31,3%) foram identificados dentre as 32 cepas produtoras de ESBLs, e 32 (56,1%) perfis dentre as 57 cepas não produtoras. O método do brometo cetiltrimetilamônio, descrito por Townsend e cols., (1985), para a extração plasmidial rápida, não foi capaz de extrair plasmídios de 24 cepas (19 não produtoras e 5 produtoras). Para estas 24 (27%) cepas nenhum plasmídio foi observado, o que não nos leva a concluir definitivamente a inexistência de plasmídios, considerando que neste grupo, 5 cepas produtoras estavam presentes. Há de se considerar também a limitação da condição eletroforética na separação de grandes moléculas. Talvez o método não seja adequado à extração de plasmídios de elevado peso molecular, o que comumente ocorre nas bactérias produtoras de ESBLs. Para a investigação de um fenômeno tão complexo como um surto causado por bactérias produtoras de ESBLs, a análise do perfil plasmidial não é por si só suficiente na identificação da relação entre os isolados; a análise plasmidial, neste caso, não constitui uma boa ferramenta para a afirmação da origem clonal de um surto e requer resolução por um método que permita uma caracterização mais precisa das cepas, um método que nos forneça informações que

ultrapassem a esfera do gênero e da espécie, e para tal propósito recorre-se à PFGE (Gouby *et al.*, 1994).

A eletroforese em campo pulsátil constitui uma ferramenta altamente reprodutível e discriminatória na tipagem de bactérias. É eximamente aplicada a uma ampla variedade de diferentes microrganismos gram-positivos e gram-negativos e mesmo às espécies de micobactérias em estudos epidemiológicos de populações nos quais temos doenças endêmicas, bem como em estudos de surtos. Uma relevante desvantagem da PFGE é a necessidade de até seis dias desde o isolamento da colônia pura do microrganismo, para a disponibilização do resultado (Matushek, Bonten e Hayden, 1996). Seis pacientes (4887, 4974, 5394, 5434, 8015, 2172) em 4 diferentes enfermarias do HMMG foram infectados com uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de ESBLs classificada no perfil J, um dos perfis mais expressivos, sugerindo uma origem clonal das cepas envolvidas e uma possível disseminação destas cepas.

A presença de surtos policlonais, observada em nossos resultados, pode ter tido importante influência da pressão seletiva antimicrobiana, tendo em vista que a diversidade das ESBLs e a preferência por determinados substratos favorecem aquelas ESBLs consideravelmente mais ativas sobre um agente beta-lactâmico correntemente prescrito em uma determinada instituição, como observam também Pfaller e Segreti, (2006).

A análise do perfil plasmidial e PFGE apresentaram concordância na discriminação da relação genética de 37 (41,6%) cepas distinguindo 16 (17,9%) cepas produtoras e 21 (23,6%) cepas não produtoras. Algumas cepas com o mesmo perfil plasmidial apresentaram diferentes relações genéticas evidenciada pela análise da PFGE. Da mesma forma, algumas cepas consideradas indistinguíveis pela PFGE, tiveram perfis plasmidiais diferentes. Nossa análise molecular indica que a disseminação de cepas de *K. pneumoniae* nos hospitais estudados provavelmente envolveu não somente a propagação de clones, mas a transferência simultânea de determinantes genéticos de resistência. Desta forma, tornam-se importantes os esforços na identificação precoce de cepas produtoras como forma de prevenção da disseminação da resistência.

Os resultados do presente estudo confirmam a excelência da PFGE para a tipagem de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs. Um elevado grau de polimorfismo de DNA foi observado entre as cepas não relacionadas epidemiologicamente provenientes dos

dois hospitais incluídos. Todas as cepas puderam ser estudadas pela PFGE, demonstrando excelentes tipabilidade e poder discriminatório.

Por fim, nossos resultados demonstram a extrema complexidade da resistência aos agentes beta-lactâmicos pela produção de ESBLs com evidentes diferenças na prevalência entre e mesmo dentro de regiões geográficas particulares. A discriminação presuntiva de cepas produtoras de ESBLs foi melhor alcançada com o teste de triagem envolvendo a mensuração dos halos das zonas de inibição do crescimento bacteriano, sendo cefotaxima o melhor substrato no teste confirmatório. Apesar do teste de aproximação (sinergismo) ter satisfatoriamente indicado a provável produção de ESBLs, torna-se digna de nota a diversidade de enzimas e substratos, uma vez que aztreonam e cefpodoxima demonstraram o maior (96%) e o menor (12,5%) índices de detecção.

Além da extensa disseminação de genes para ESBLs contidos em plasmídios, a grande variabilidade genômica demonstrada pelas cepas produtoras de ESBLs sugere também a contínua seleção de mutantes resistentes. Gales e cols. (1997) avaliando os padrões de suscetibilidade *in vitro* de 30 agentes antimicrobianos contra cepas nacionais de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs no período de janeiro de 1995 a outubro de 1996, envolvendo hospitais terciários localizados em São Paulo e Rio de Janeiro constataram que os compostos mais ativos (100% de suscetibilidade) foram: meropenem (MIC<sub>90</sub>: 0,125 µg/mL), imipenem (MIC<sub>90</sub>: 0,25 µg/mL) e cefotetan (MIC<sub>90</sub>: 2 µg/mL). Com 92% e 74% de suscetibilidade estavam cefepime (MIC<sub>90</sub>: 6 µg/mL) e ciprofloxacina (MIC<sub>90</sub>: 1 µg/mL), respectivamente. Nenhum dos aminoglicosídeos testados mostrou boa atividade (16% - 41% de suscetibilidade). Da mesma forma, monobactâmicos (aztreonam) e outras classes de antibióticos, como cloranfenicol, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprima mostraram fraca atividade contra os isolados em estudo. O trabalho de Sader e cols., (1998) destaca imipenem e ciprofloxacina como compostos mais ativos contra cepas de *K. pneumoniae*, sendo a suscetibilidade de 100% e 93%, respectivamente.

No presente estudo, procuramos avaliar a frequência de ocorrência e os fatores de risco para a aquisição de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs. Encontramos uma elevada frequência de ocorrência (36%) dentre pacientes admitidos em nossas instituições cujo fator de risco independente para a aquisição de infecções por cepas produtoras de ESBLs foi número total de antibióticos (OR, 1,60; IC<sub>95%</sub>, 1,194-2,145; *P* = 0,0017). Vários

fatores são descritos por aumentarem o risco de colonização ou infecção por bacilos Gram-negativos produtores de ESBLs (Anexo IX). Uso prévio de antibióticos constitui um dos mais importantes. Certos procedimentos invasivos e manipulações médicas parecem contribuir para colonização e infecção por microrganismos produtores de ESBLs (Pfaller e Segreti, 2006). Estudos recentes sugerem que de todas as classes de antibióticos, as cefalosporinas de terceira geração são as que mais expõem os pacientes ao risco de infecção por microrganismos multirresistentes, incluindo bactérias produtoras de ESBLs (Kanafani *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006). Outros antibióticos, como fluoroquinolonas e cefalosporinas de segunda geração, são também responsabilizados, porém, em menor extensão (Kanafani *et al.*, 2005).

Os antibióticos beta-lactâmicos representam 50% do uso total de antibióticos. Seu sucesso resulta da sua baixa toxicidade, forte ação antibacteriana e flexibilidade no que diz respeito à atividade (capacidade de ser modulada de acordo com as características moleculares do anel beta-lactâmico). Assim, os beta-lactâmicos diferem entre si quanto ao seu espectro de ação e quanto à estabilidade diante da ação de beta-lactamases (Cereda *et al.*, 1999).

A expressiva percentagem de pacientes sob uso prévio de agentes antimicrobianos do presente estudo (87,6%) chama-nos atenção principalmente em razão do aparecimento de cepas produtoras de ESBLs justamente neste grupo de pacientes e a não detecção de cepas produtoras no restrito grupo de pacientes que não receberam terapia antimicrobiana prévia (11 pacientes; 12,36%) – Gráfico 9.

Pela análise univariada, os fatores associados à infecção por cepas produtoras de ESBLs foram: uso de cefalosporinas de quarta-geração, lincosâmica (clindamicina), carbapenêmicos, glicopeptídios, cirurgia recente, traqueostomia, idade, dias em uso de lincosamida, glicopeptídios, número total de antibióticos e duração da terapia antimicrobiana. Dentre estes fatores identificados pela análise univariada, encontram-se variáveis associadas com fatores que aumentam a suscetibilidade à colonização do trato gastrointestinal, como o uso de diferentes classes de antibióticos, que por sua vez, podem refletir a severidade da doença do paciente, especialmente daqueles em uso de carbapenêmicos e glicopeptídios. Evidencia-se cada vez mais o declínio funcional como

importante fator de risco para infecção dentre os pacientes hospitalizados em enfermarias de cuidados prolongados (Ben-Ami *et al.*, 2006).

Considerando todos os pacientes incluídos no presente estudo, o tempo médio geral de hospitalização foi de 36,5 dias (Gráfico 8). Para os 32 pacientes com infecção por cepas produtoras de ESBLs o tempo médio foi de 44,5 dias enquanto que para os 57 pacientes com infecção por cepas não produtoras, o tempo médio foi de 32 dias ( $P$  valor = 0,4693). Quanto maior o tempo de permanência hospitalar, maior probabilidade de aquisição de cepas produtoras de ESBLs, talvez por serem os pacientes mais frequentemente expostos às intervenções invasivas e à ação de antibióticos (Lin, Huang e Lai, 2003).

O processo de colonização ou infecção por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs usualmente tem início com a colonização do paciente e da equipe de profissionais da saúde ou dos objetos contaminados (Lin, Huang e Lai, 2003). A terapia antimicrobiana promove a colonização ou infecção do paciente por microrganismos resistentes ao erradicar tanto a microbiota normal como as cepas sensíveis e ao modificar a resistência do hospedeiro à colonização (Lin, Huang e Lai, 2003; Tumbarello *et al.*, 2006). Já as manipulações invasivas permitem a transmissão direta dos patógenos (Lin, Huang e Lai, 2003). Ainda, a erradicação ou redução da microbiota normal suscetível à droga pode também elevar a vulnerabilidade à aquisição de novas cepas resistentes. Um microrganismo resistente a múltiplas drogas pode estar mais sujeito à seleção pelo uso de qualquer uma delas, o que, por sua vez, reduz as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por cepas produtoras de ESBLs. Assim, a vigilância da disseminação bacteriana torna-se extremamente importante (Tumbarello *et al.*, 2006).

A atenção deve ser redirecionada ao uso injustificado de antibióticos de amplo espectro, seja no ambiente hospitalar, seja no ambiente comunitário (Kanafani *et al.*, 2005), considerando, especialmente os recentes estudos que revelam o aparecimento de infecções do trato urinário e bacteremias em pacientes não hospitalizados (Colodner *et al.*, 2004; Ben-Ami *et al.*, 2006).

Dados da literatura sobre infecção ou colonização por enterobactérias produtoras de ESBLs são publicados principalmente em estudos envolvendo pacientes hospitalizados. No entanto, o isolamento de enterobactérias produtoras de ESBLs, obtidas de animais e de pacientes na comunidade é também descrito, sendo o paciente de condição clínica crônica

ou não. O trabalho de Mesa e cols., (2006), pesquisando a presença de enterobactérias produtoras de ESBLs em diferentes ambientes (hospitalar, urbano, rural e esgoto e em alimentos) traz dados curiosos sobre a prevalência de isolados produtores de ESBLs. Segundo os autores, a prevalência global das cepas produtoras de ESBLs, dentre as 8020 enterobactérias causadoras de infecções avaliadas, foi de 1,9%, sendo de 0,17 a percentagem de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs neste conjunto (14 cepas). Ainda, considerando as 1792 amostras provenientes de eventos não infecciosos (de indivíduos colonizados, de esgoto humano, de fazendas aviárias, suínas e de coelhos, de fontes alimentares e de surtos de origem alimentar) o isolamento de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs representou 0,11% (1 caso de fonte alimentar e outro de paciente não hospitalizado). Enterobactérias produtoras de ESBLs foram detectadas nas 5 amostras de esgoto urbano, em amostras de 8 das 10 fazendas de porcos, de 2 das 10 fazendas de coelhos, de todas as 10 amostras de aves e de 3 das 738 amostras alimentares, revelando que a comunidade pode atuar como reservatório para tais cepas, sendo possível a disseminação de enterobactérias produtoras de ESBLs através de alimentos. Liebana e cols. (2006) investigando a ocorrência de cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs (CTX-M) em uma fazenda, destacam a transferência horizontal plasmidial entre as cepas, bem como a transferência de genes entre plasmídios, contribuindo para a disseminação da resistência.

Com relação ao estudo dos fatores de risco para infecção nosocomial por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs do presente estudo, é oportuno mencionar que nosso trabalho traz as limitações típicas dos estudos observacionais retrospectivos. Apesar do ajuste para as variáveis mais obviamente envolvidas em infecção por *K. pneumoniae* produtores de ESBLs, não podemos completamente descartar outras variáveis possivelmente importantes, porém não incluídas, como por exemplo, os índices de gravidade clínica dos pacientes. É importante que os fatores de risco para infecção por patógenos produtores de ESBLs sejam identificados para o desenvolvimento de estratégias que visem a sua limitação (Kang *et al.*, 2004b; Hyle *et al.*, 2005). Isso traz importantes implicações no controle das infecções nosocomiais, uma vez que cepas produtoras de ESBLs no ambiente hospitalar agregam sérios riscos aos procedimentos invasivos (Kang *et al.*, 2004b).

Estudos precedentes relatam o controle de surtos com a adoção das seguintes medidas: restrição, controle ou troca de antibióticos; isolamento de pacientes infectados ou colonizados e aplicação das técnicas rigorosas para o controle de infecção (incluindo a desinfecção extensiva das alas hospitalares e dos equipamentos não passíveis de descarte). Ainda, a diminuição das taxas de colonização por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs descrita por outros autores é obtida com o uso da combinação piperacilina-tazobactam, em substituição à ceftazidima, em situações de tratamento empírico das infecções nosocomiais, existindo ainda, trabalhos revelando a terapia com um inibidor de beta-lactamases como fator protetor (Sader *et al.*, 2001).

O impacto das estratégias antimicrobianas sobre os microrganismos resistentes pode variar dependendo das espécies bacterianas e o tipo de mecanismo de resistência envolvido. A redução do uso de antimicrobianos traria diminuição da resistência microbiana, mas a redução do uso total de antibióticos no hospital, infelizmente é muito difícil e nem sempre eficiente. Em anos recentes temos observado o estabelecimento de esforços objetivando a racionalização do gerenciamento do arsenal antimicrobiano disponível, mais do que a redução do seu uso total. Na área clínica, a alternância de diferentes classes de antibióticos durante períodos pré-definidos tem sido proposta como uma forma estruturada da introdução de heterogeneidade antimicrobiana (Sandiumenge *et al.*, 2006).

A campanha do CDC de prevenção da resistência antimicrobiana em unidades de saúde identifica quatro estratégias para prevenir a disseminação de patógenos resistentes: (1) prevenção da infecção; (2) prevenção da transmissão; (3) diagnóstico efetivo e tratamento da infecção; (4) otimização do uso de agentes antimicrobianos. Intervenções-chaves para o controle de infecções incluem a efetiva higienização das mãos usando anti-sépticos à base de álcool ou produtos destinados a esta finalidade (tais como os contendo clorexidina), sistemas de vigilância para monitorização e identificação de patógenos importantes, precauções de contato com a utilização de luvas e aventais, apropriada desinfecção do ambiente e redução do uso geral de antibióticos, especialmente as cefalosporinas de terceira geração (Weber, 2006).

Aperfeiçoamento da vigilância para o controle de infecções, além das intervenções apropriadas para o uso racional de antimicrobianos, provavelmente sejam as melhores

ações para a contenção da emergência futura de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs (Hyle *et al.*, 2005).

Com relação à terapêutica para as infecções por cepas produtoras de ESBLs são dignos de destaque os agentes antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos por conterem um anel  $\beta$ -lactâmico mais resistente à hidrólise por aquelas enzimas (Lee, Kuti e Nicolau, 2006). Paterson e cols., (2004) conduziram um estudo prospectivo multicêntrico envolvendo pacientes infectados por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs e encontraram que a não utilização de carbapenêmicos no tratamento de bacteremia causada por tais cepas estava associada com uma taxa mais elevada de mortalidade. Em contraste, um recente estudo Coreano, avaliando bacteremia causada por cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* revela que a mortalidade entre pacientes recebendo terapia apropriada (carbapenêmicos ou ciprofloxacina) não era diferente da mortalidade entre pacientes que recebiam a terapia inapropriada (cefalosporinas) (Kang *et al.*, 2004a). Hyle e cols., (2005) revelam que o uso da terapia antimicrobiana inadequada constitui fator de risco independente para mortalidade em pacientes com infecção não urinária, por *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBLs. Lee e cols., (2006) observam que pacientes com infecções por cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs apresentavam mais falência clínica do que os pacientes-controle (pacientes com infecção por cepas não produtoras de ESBLs) e que a taxa de sucesso terapêutico para os pacientes-caso, cujo tratamento inicial envolvia antibióticos que não carbapenêmicos, era inferior àquela observada para os pacientes-controle. Obtiveram sucesso terapêutico os pacientes para os quais fora administrado carbapenêmico, independente da condição fenotípica do patógeno em questão. Existe a associação entre consumo de carbapenêmicos e ventilação mecânica com colonização ou infecção por microrganismos considerados problemáticos incluindo *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, enquanto que o uso de cefalosporinas é associado à aquisição de infecções por enterococos vancomicina-resistentes, por bacilos Gram-negativos produtores de ESBLs e à colonização ou à superinfecção por *Clostridium difficile* (Weber, 2006).

Deste modo, finalizando, o presente trabalho revela a dinâmica das infecções nosocomiais por cepas produtoras de ESBLs em dois hospitais da rede pública de saúde,

não somente para a caracterização clínica dos pacientes, mas para a integração de dados epidemiológicos e laboratoriais para uma melhor compreensão das ESBLs. Utilizando métodos internacionais, preocupou-nos conhecer sobretudo a realidade nacional, ainda que de forma restrita, mas com dados pouco explorados nos trabalhos brasileiros, como a análise plasmidial e a identificação do melhor substrato tanto para os testes de triagem, como para os testes confirmatórios. Ainda que a inativação de agentes beta-lactâmicos possa ser promovida por ESBLs, este mecanismo de resistência não pode ser tomado como algo isolado e exclusivo. O conhecimento da participação de porinas, de enzimas AmpC, de fatores como efeito inóculo, melhor substrato para detecção e associação de todos estes elementos são de extrema importância na construção de nossa análise crítica sobre o assunto, que seguramente, não se encerra neste trabalho, ainda que tivera o sonho de ver resolvida a questão da resistência bacteriana para a obtenção do sucesso terapêutico em todos os pacientes infectados. O uso criterioso de agentes antimicrobianos, a redução da seleção e a disseminação de microrganismos produtores de ESBLs e sobretudo o conhecimento dos mecanismos de resistência envolvidos ainda são elementos fundamentais na prática do controle das infecções hospitalares.

## ***8. CONCLUSÕES***

É expressiva a produção de ESBLs nas instituições estudadas;

Os pacientes com infecção nosocomial por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs apresentaram mais frequentemente infecções urinárias e de corrente sanguínea, tendo as infecções acometido mais o gênero masculino, pertencendo os pacientes às especialidades Clínica Médica, Clínica Cirúrgica e Neuroclínica. Na sua maioria, os pacientes haviam recebido antibioticoterapia prévia e apresentaram cura-clínica, com tempo de internação relativamente prolongado;

A disseminação de cepas de *K. pneumoniae* provavelmente envolveu não somente a propagação de clones, mas a transferência simultânea de determinantes genéticos de resistência. A importante variedade genômica demonstrada pela PFGE para as cepas produtoras de ESBLs sugere a contínua seleção de mutantes resistentes.

O método do brometo cetiltrimetilamônio não é adequado à extração de plasmídios de elevado peso molecular, não sendo a análise plasmidial, por si só, suficiente na identificação da relação epidemiológica dentre os isolados bacterianos;

A PFGE demonstrou melhor poder discriminatório e melhor tipabilidade, como método de tipagem molecular;

Dos testes de triagem, a mensuração do diâmetro da zona de inibição forneceu mais indícios da possível produção de ESBLs, quando comparada ao teste de sinergismo (aproximação de discos);

No teste de aproximação de discos, o efeito sinérgico da molécula de clavulanato foi mais evidenciado com o substrato aztreonam, seguido de cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefpodoxima, respectivamente;

No teste confirmatório, a utilização da combinação cefotaxima e cefotaxima mais ácido clavulânico, permitiu a identificação de maior número de cepas produtoras de ESBLs;

Número total de antibióticos constituiu única variável associada à infecção nosocomial por cepa de *K. pneumoniae* produtora de ESBLs, revelada pela análise multivariada.

## ***9. ORÇAMENTO***

---

<b>Item</b>	<b>Valor R\$</b>
<b>Material permanente</b>	<b>26000,00</b>
<b>Material de consumo</b>	<b>13000,00</b>
<b>Total</b>	<b>39000,00</b>

---

## ***10. CRONOGRAMA***

Número de meses previstos: 48meses.

Etapa	Meses												
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
Levantamento do número de pacientes com IH por <i>K. pneumoniae</i>	X												
Localização das cepas e estudo da viabilidade	X	X											
Identificação das cepas possivelmente produtoras de ESBLs			X	X	X	X	X	X	X				
Identificação das cepas produtoras de ESBLs	X										X	X	X
Análise plasmidial		X	X	X	X								
Análise do DNA cromossômico						X	X	X	X	X			
Coleta de dados clínicos	X											X	X
Análise dos resultados		X	X	X									
Qualificação e elaboração da tese					X	X	X	X	X	X	X	X	X

## ***11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

AMBLER, R. P. – The structure of  $\beta$ -lactamases. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. (B):** 321-331, 1980.

ARBER, R. C.; MACKEL, D. C. – Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. **Am. J. Med., 70:** 901-905, 1981.

ARPIN, C.; DUBOIS, V.; COULANGE, L.; ANDRÉ, C.; FISCHER, I.; NOURY, P.; GROBOST, F.; BROCHET, J. P.; JULLIN J.; DUTILH, B.; LARRIBET, G.; LAGRANGE, I.; QUENTIN, C. – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. **Antimicrob. Agents Chemother., 47(11):** 3506-3514, 2003.

AZEVEDO, P. A.; GONÇALVES, A. L. S.; MUSSKOPF, M. I.; RAMOS, C. G.; DIAS, C. A. G. – Laboratory tests in the detection of extended spectrum beta-lactamase production: national committee for clinical laboratory standard (NCCLS) screening test, the E-test, the double disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. **Braz. J. Infect. Dis., 8(5):** 372-377, 2004.

BABINI, G. S.; LIVERMORE, D. M. – Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. **J. Antimicrob. Chemother., 45:** 183-189, 2000.

BAUER A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRY, J. C. – Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol. 45:** 493-496, 1966.

BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; THE SENTRY APAC STUDY GROUP. – Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 42:** 193-198, 2002.

BEN-AMI, R.; SCHWABER, M. J.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHWARTZ, D.; GILADI, M.; CHMELNITSKY, I.; LEAVITT, A.; CARMELI, Y. – Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. **Clin. Infect. Dis.**, **42**: 925-934, 2006.

BERTRAND, X.; HOCQUET, D.; BOISSON, K.; SIEBOR, E.; PLÉSIAT, P.; TALON, D. – Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a French university-affiliated hospital. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **22**: 128-133, 2003.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24 ed., São Paulo, Melhoramentos, 1990, 1234p.

BLOMBERG, B.; JUREEN, R.; MANJI, K. P.; TAMIM, B. S.; MWAKAGILE, D. S. M.; URASSA, W. K.; FATAKI, M.; MSANGI, V.; TELLEVIK, M. G.; MASELLE, S. Y.; LANGELAND, N. – High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by Gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. **J. Clin. Microbiol.**, **43(2)**: 745-749, 2005.

BONFIGLIO, G.; PERILLI, M.; STEFANI, S.; AMICOSANTE, G.; NICOLETTI, G. – Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae*: an Italian survey. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **19**: 213-217, 2002.

BOUCHILLON, S. K.; JOHNSON, B. M.; HOBAN, D. J.; JOHNSON, J. L.; DOWZICKY, M. J.; WU, D. H.; VISALLI, M. A.; BRADFORD, P. A. – Determining incidence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEALS study 2001-2002. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **24**: 119-124, 2004.

BRADFORD, P. A. – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14(4)**: 933-951, 2001.

BRADFORD, P. A.; CHERUBIN, C. E.; IDEMYOR, V.; RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. – Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago Hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamases in a single isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **38(4)**: 761-766, 1994.

BUSH, K. – Characterization of beta-lactamases (minireviews). **Antimicrob. Agents Chemother.**, **33(3)**: 259-263, 1989a.

BUSH, K. – Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **33(3)**: 264-270, 1989b.

BUSH, K. – Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **33(3)**: 271-276, 1989c.

BUSH, K. – New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.**, **32**: 1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. – Nomenclature of TEM  $\beta$ -lactamases. **J. Antimicrob. Chemother.**, **39**: 1-3, 1997.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. – A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39(6)**: 1211-1233, 1995.

BUSH, K.; SYKES, R. B. – Methodology for the study of beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **30(1)**: 6-10, 1986.

CEREDA, R. F.; SADER, H. S.; BARTH, A. L.; SEGURA, A.; KAGE, R.; NOVAKONSKI, A.; PIGNATARI, A. C. Evaluation of the *in vitro* activity of two fourth-

generation cephalosporins against bacterial samples isolated from patients in several Brazilian hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.**, **3(5)**: 189-196, 1999.

CHANAL, C.; SIROT, D.; ROMASZKO, J. P.; BRET, L.; SIROT, J. – Survey of prevalence of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, **38**: 127-132, 1996.

CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W. – Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric field. **Science**, **234**: 1582-1585, 1986.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved standard M100-S15. National Committee for Clinical Laboratory Standards 940, West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

COLODNER, R.; ROCK, W.; CHAZAN, B.; KELLER, N.; GUY, N.; SAKRAN, W.; RAZ, R. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **23**: 163-167, 2004.

COLODNER, R.; SAMRA, Z.; KELLER, N.; SPRECHER, H.; BLOCK, C.; PELED, N.; LAZAROVITCH, T.; BARDENSTEIN, R.; SCHWARTZ-HARARI, O.; CARMELI, Y.; THE ISRAEL ESBL GROUP – First national surveillance of susceptibility of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. to antimicrobials in Israel. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **57**: 201-205, 2007.

CORKILL, J. E.; CUEVAS, L. E.; GURGEL, R. Q.; GREENSILL, J.; HART, C. A. – SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **J. Antimicrob. Chemother.**, **47**: 463-465, 2001.

CORMICAN, M. G.; MARSHALL, S. A.; JONES, R. N. – Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. **J. Clin. Microbiol.**, **34(8)**: 1880-1884, 1996.

COUDRON, P. E.; MOLAND, E. S.; SANDERS, C. C. – Occurrence and detection of extended-spectrum beta-lactamases of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. **J. Clin. Microbiol.**, **35(10)**: 2593-2597, 1997.

DALEY, C. L.; SMALL, P. M.; SCHECTER, G. F. – An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. Analysis using restriction-fragment length polymorphisms. **N. Engl. J. Med.**, **326**: 231-235, 1992.

DANDEKAR, P. K.; TETREAULT, J.; QUINN, J. P.; NIGHTINGALE, C. H.; NICOLAU, D. P. – Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in a large community teaching hospital in Connecticut. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **49**: 37-39, 2004.

DAOUD, Z.; HAKIME, N. – Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. **Rev. Esp. Quimioterap.** **16(2)**: 233-238, 2003.

DICE, L. R. – Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, **26(3)**: 297-302, 1945.

DOEBBELING, B. N.; HOLLIS, R.; ISENBERG, H. O.; WENZEL, R. P.; PFALLER, M. A. – Restriction fragmentation analysis of *Candida tropicalis* outbreak of sternal wound infections. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 1268-1270, 1991.

DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; HERNÁNDEZ-ALLÉS, S.; CONEJO, M. D. C.; PASCUAL, A.; TOMÁS, J. M.; ALBERTÍ, S.; BENEDÍ, V. J. – Role

of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47(10)**: 3332-3335, 2003.

DU, B.; LONG, Y.; LIU, H.; CHEN, D.; LIU, D.; XU, Y.; XIE, X. – Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. **Intensive Care Med.**, **28**: 1718-1723, 2002.

EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I.; EDELSTEIN, I.; STRATCHOUNSKI, L. – Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47(12)**: 3724-3732, 2003.

EISENSTEIN, B. I. – New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. **J. Infect. Dis.**, **161**: 595-602, 1990 a.

EISENSTEIN, B. I. – The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **N. Engl. J. Med.**, **322**: 178-183, 1990 b.

EMERY, C. L.; WEYMOUTH, L. A. – Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. **J. Clin. Microbiol.**, **35(8)**: 2061-2067, 1997.

FARRAR, W. E. – Molecular analysis of plasmids in epidemiologic investigation. **J. Infect. Dis.**, **148**: 1-6, 1983.

GALES, A. C.; BOLMSTRÖM, A.; SAMPAIO, J.; JONES, R. N.; SADER, H. S. – Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) isolated in hospitals in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, **1(4)**: 196-203, 1997.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; JONES, R. N.; THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA) – Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report

from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **44**: 289-299, 2002a.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; JONES, R. N. – Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **44**: 301-311, 2002b.

GANGOUÉ-PIÉBOJI, J.; BEDENIC, B.; KOULLA-SHIRO, S.; RANDEGGER, C.; ADIOGO, D.; NGASSAM, P.; NDUMBE, P.; HÄCHLER, H. – Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Yaounde, Cameroon. **J. Clin. Microbiol.**, **43(7)**: 3273-3277, 2005.

GARNER, J. S.; JARVIS, W. R.; EMORI, T. G.; HORAN, T. C.; HUGHES, J. M. – CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **J. Infect. Control**, **16**: 128-140, 1988.

GETCHELL-WHITE, S. I.; DONOWITZ, L. G.; DIETER, H. M.; GRÖSCHEL, D. H. M. – The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **10**: 402-407, 1989.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; LEELAPORN, A.; KARIM, A.; TRIBUDDHARAT, C.; FENNEWALD, M.; NORDMANN, P. – Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. **J. Clin. Microbiol.**, **39(1)**: 175-182, 2001.

GOERING, R. V.; DUENSING, T. D. – Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of Staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, **28(3)**: 426-429, 1990.

GOERING, R. V. – Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **14**: 595-600, 1993.

GOUBY, A.; NEUWIRTH, C.; BOURG, G.; BOUZIGES, N.; CARLES-NURIT, M. J.; DESPAUX, E.; RAMUZ, M. – Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. **J. Clin. Microbiol.**, **32(2)**: 301-305, 1994.

GUPTA, A.; DELLA-LATTA, P.; TODD, B.; SAN GABRIEL, P.; HAAS, J.; WU, F.; RUBENSTEIN, D.; SAIMAN, L. – Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **25**: 210-215, 2004.

GUSTAFERRO, C. A.; STECKELBERG, J. M. – Cephalosporin antimicrobial agents and related compounds. **Mayo Clin. Proc.**, **66**: 1064-1073, 1991.

HARRISON, T. R.; FAUCI, A. S.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K. J.; WILSON, J. D.; MARTIN, J. B.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L. – **Medicina interna**. 14 ed., Rio de Janeiro, MacGrawHill, 1998. p.799.

HENRY, J. B. – **Diagnósticos clínicos & tratamento por métodos laboratoriais**. 18 ed., São Paulo, Editora Manole LTDA, 1995, p. 1513-1524.

HERNÁNDEZ-ALLÉS, S.; ALBERTÍ, S.; ÁLVAREZ, D.; DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GIL, J.; TOMÁS, J. M.; BENEDÍ, V. J. – Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology**, **145**: 673-679, 1999.

HERNÁNDEZ, J. R.; PASCUAL, A.; CANTÓN, R.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GRUPO DE ESTUDIO DE INFECCIÓN HOSPITALARIA (GEIH) – *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales

españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, **21(2)**: 77-82, 2003.

HIRAKATA, Y.; MATSUDA, J.; MIYAZAKI, Y.; KAMIHIRA, S.; KAWAKAMI, S.; MIYAZAWA, Y.; ONO, Y.; NAKAZAKI, N.; HIRATA, Y.; INOUE, M.; TURNIDGE, J. D.; BELL, J. M.; JONES, R. N.; KOHNO, S.; THE SENTRY ASIA-PACIFIC PARTICIPANTS. – Regional variation in the prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **52**: 323-329, 2005.

HO, P. L.; TSANG, D. N.; QUE, T. L.; HO, M.; YUEN, K. Y. – Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. **APMIS.**, **108**: 237-240, 2000.

HYLE, E. P.; LIPWORTH, A. D.; ZAOUTIS, T. E.; NACHAMKIN, I.; FISHMAN, N. °; BILKER, W. B.; MAO, X.; LAUTENBACH, E. – Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. **Clin. Infect. Dis.**, **40**: 1317-1324, 2005.

JACOBY, G. A.; HAN, P. – Detection of the extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, **34(4)**: 908-911, 1996.

JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. – More extended-spectrum beta-lactamases (minireview). **Antimicrob. Agents Chemother.**, **35(9)**: 1697-1704, 1991.

JARLIER, V.; NICOLAS, M. H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. – Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis.**, **10(4)**: 867-878, 1988.

JARVIS, W. R. – The epidemiology of colonization. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **17**: 47-52, 1996.

JEONG, S. H.; BAE, I. K.; KWON, S. B.; LEE, J. H.; JUNG, H. I.; SONG, J. S.; JEONG, B. C. – Investigation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. **Lett. Appl. Microbiol.**, **39**: 41-47, 2004a.

JEONG, S. H.; BAE, I. K.; LEE, J. H.; SOHN, S. G.; KANG, G. H.; JEON, G. J.; KIM, Y. H.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. – Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. **J. Clin. Microbiol.**, **42(7)**: 2902-2906, 2004b.

KANAFANI, Z. A.; MEHIO-SIBAI, A.; ARAJ, G. F.; KANAAN, M.; KANJ, S. S. – Epidemiology and risk factors for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms: a case control study at a tertiary care center in Lebanon. **Am. J. Infect. Control**, **33**: 326-332, 2005.

KANG, C. I.; KIM, S. H.; KIM, D. M.; PARK, W. B. – Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **48**: 4574-4581, 2004a.

KANG, C. I.; KIM, S. H.; KIM, D. M.; PARK, W. B.; LEE, K. D.; KIM, H. B.; OH, M. D.; KIM, E. C.; CHOE, K. W. – Risk factors for and clinical outcomes of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **25**: 860-867, 2004b.

KARLOWSKY, J. A.; JONES, M. E.; THORNSBERRY, C.; FRIEDLAND, I. R.; SAHM, D. F. – Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from

hospitalized patients in the United States from 1998 to 2001. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47(5)**: 1672-1680, 2003.

KATSANIS, G. P.; SPARGO, J.; FERRARO, M. J.; SUTTON, L.; JACOBY, G. A. – Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. **J. Clin. Microbiol.**, **32(3)**: 691-696, 1994.

KIM, J.; KWON, Y.; PAI, H.; KIM, J. W.; CHO, D. T. – Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. **J. Clin. Microbiol.**, **36(5)**: 1446-1449, 1998.

KIM, J.; LIM, Y. M.; RHEEM, I.; LEE, Y.; LEE, J. C.; SEOL, S. Y.; LEE, Y. C.; CHO, D. T. – CTX-M and SHV-12  $\beta$ -lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from 3 university hospitals within Korea. **FEMS Microb. Lett.**, **245**: 93-98, 2005.

KLIEBE, C.; NIES, B. A.; MEYER, J. F.; TOLXDORFF-NEUTZLING, R. M.; WIEDEMANN, B. – Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **28(2)**: 302-307, 1985.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRUMHOLTZ, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. – Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, **11**: 315-317, 1983.

KOLAR, M.; LATAL, T.; CERMAK, P.; BARTONIKOVA, N.; CHMELAROVA, E.; SAUER, P.; KESSELOVA, M. – Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Czech Republic. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **28**: 49-53, 2006.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr. W. C.; WOODS, G. L. – **Diagnostic microbiology**. 6 ed., Philadelphia, Lippincott, 2006.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. – **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1988.

KURUPATI, P.; TEH, B. K.; KUMARASINGHE, G.; POH, C. L. – Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis. **Proteomics**, **6**: 836-844, 2006.

LAUNTENBACH, E.; PATEL, J. B.; BILKER, W. B.; EDELSTEIN, P. H.; NEIL, O. F. – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. **Clin. Infect Dis.**, **32**: 1162-1171, 2001.

LEE, S. O.; LEE, E. S.; PARK, S. Y.; KIM, S. Y.; SEO, Y. H.; CHO, Y. K. C. – Reduced use of third-generation cephalosporins decreases the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **25**: 832-837, 2004.

LEE, S. Y.; KUTI, J. L.; NICOLAU, D. P. – Cefepime pharmacodynamics in patients with extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and non-ESBL infections. **J. Infect.**, 1-6, 2006.

LIN, M. F.; HUANG, M. L.; LAI, S. H. – Risk factors in the acquisition of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *Klebsiella pneumoniae*: a case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. **J. Hosp. Infect.**, **53**: 39-45, 2003.

LIEBANA, E.; BATCHELOR, M.; HOPKINS, K. L.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; TEALE, C. J.; FOSTER, A.; BARKER, L.; THRELFALL, E. J.; DAVIES, R. H. –

Longitudinal farm study of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. **J. Clin. Microbiol.**, **44(5)**: 1630-1634, 2006.

LIU, P. Y. F.; TUNG, J. C.; KE, S. C.; CHEN, S. L. – Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a District Hospital in Taiwan. **J. Clin. Microbiol.**, **36(9)**: 2759-2762, 1998.

LUPSKI, J. R. – Molecular epidemiology and its clinical application. **JAMA**, **270**: 1363-1364, 1993.

MANGENEY, N.; NIEL, P.; PAUL, G.; FAUBERT, E.; HUE, S.; DUPEYRON, C.; LOUARN, F.; LELUAN, G. – A 5-year epidemiological study of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a medium- and long-stay neurological unit. **J. Appl. Microbiol.** **88**: 504-511, 2000.

MARCOS, M. A.; JIMENEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. – Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J. Med. Microbiol.**, **42**: 328-335, 1985.

MARRA, A. R.; PEREIRA, C. A. P.; CASTELO, A.; CARMO FILHO, J. R.; CAL, R. G. R.; SADER, H. S.; WEY, S. B. – Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae*-produced extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) in a hospital with high prevalence of this infection. **Int. J. Infect. Dis.**, **10**: 56-60, 2006a.

MARRA, A. R.; WEY, S. B.; CASTELO, A.; GALES, A. C.; CAL, R. G. R.; FILHO, J. R. C.; EDMOND, M. B.; PEREIRA, C. A. P. – Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. **BMC Infect. Dis.**, **Feb.14**, **6(1)**: 24, 2006b.

MARTÍNEZ, J. A.; AGUILAR, J.; ALMELA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; LÓPEZ, F.; BALASSO, V.; POZO, L.; MENSA, J. – Prior use of carbapenems may be a significant risk factor for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella* spp. in patients with bacteraemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, **58**: 1082-1085, 2006.

MASLOW, J. N.; BRECHER, S.; GUNN, J.; DURBIN, A.; ARBEIT, R. D. – Variation and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among individual patients over extended periods of time. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **14**: 282-290, 1995.

MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E., ARBEIT, R. D. – Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**, **17**: 153-164, 1993.

MATUSHEK, M. G.; BONTEN, M. J. M.; HAYDEN, M. K. – Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, **34(10)**: 2598-2600, 1996.

MENDELSON, G.; HAIT, V.; BEN-ISRAEL, J.; GRONICH, D.; GRANOT, E.; RAZ, R. – Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an Israeli long-term care facility. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **24**: 17-22, 2005.

MESA, R. J.; BLANC, V.; BLANCH, A. R.; CORTÉS, P.; GONZÁLEZ, J. J.; LAVILLA, S.; MIRÓ, E.; MUNIESA, M.; SACO, M.; TÓRTOLA, M. T.; MIRELIS, B.; COLL, P.; LLAGOSTERA, M.; PRATS, G.; NAVARRO, F. – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). **J. Antimicrob. Chemother.**, **58**: 211-215, 2006.

MIRÓ, E.; MIRELIS, B.; NAVARRO, F.; RIVERA, A.; MESA, R. J.; ROIG, M. C.; GÓMEZ, L.; COLL, P. – Surveillance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from clinical

samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. **J. Antimicrob. Chemother.**, **56**: 1152-1155, 2005.

MOLAND, E. S.; SANDERS, C. C.; THOMSON, K. S. – Can results obtained with commercially available MicroScan Microdilution Panels serve as an indicator of  $\beta$ -lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam? **J. Clin. Microbiol.**, **36(9)**: 2575-2579, 1998.

MORRIS, D.; O'HARE, C.; GLENNON, M.; MAHER, M.; CORBETT-FEENEY, G.; CORMICAN, M. – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Ireland, including a novel enzyme, TEM-102. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47(8)**: 2572-2578, 2003.

MOTTA, R. N.; OLIVEIRA, M. M.; MAGALHÃES, P. S. F.; DIAS, A. M.; ARAGÃO, L. P.; FORTI, A. C.; CARVALHO, C. B. M. – Plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing strains of *Enterobacteriaceae* isolated from diabetes foot infections in a Brazilian diabetic center. **Braz. J. Infect. Dis.**, **7(2)**: 129-134, 2003.

NIJSSEN, S.; FLORIJN, A.; BONTEN, M. J. M.; SCHMITZ, F. J.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. – Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **24**: 585-591, 2004.

OPLUSTIL, C. P.; NUNES, R.; MENDES, C.; THE RESISTNET GROUP. – Multicenter evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET surveillance program. **Braz. J. Infect. Dis.**, **5(1)**: 8-12, 2000.

PAI, H.; LYU, S.; LEE, J. H.; KIM, J.; KWON, Y.; KIM, J. W.; CHOE, K. W. – Survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella*

*pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. **J. Clin. Microbiol.**, **37(6)**: 1758-1763, 1999.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol. Rev.**, **18(4)**: 657-686, 2005.

PATERSON, D. L.; KO, W. C.; VonGOTTBERG, A. – Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. **Clin. Infect. Dis.**, **39**: 31-37, 2004.

PATERSON, D. L.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; YEISER, B.; BONOMO, M. D.; RICE, L. B.; BONOMO, R. A.; INTERNATIONAL *Klebsiella* STUDY GROUP. – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47(11)**: 3554-3560, 2003.

PATTERSON, J. E.; VECCHIO, J.; PANTELICK, E. L. – Association of contaminated gloves with transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* in an intensive care unit. **Am. J. Med.**, **91**: 479-483, 1991.

PAYNE, D. J.; CRAMP, R.; WINSTANLEY, D. J.; KNOWLES, D. J. C. – Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **38(4)**: 767-772, 1994.

PETERSON, L. R.; KELLY, P. J. – The role of the clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, **7**: 277-293, 1993.

PFALLER, M. A. – Typing methods for epidemiology investigation. In **Manual of Clinical Microbiology**, 5<sup>th</sup> ed. A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Hermann Jr., H. D. Isenberg, H. J. Shadomy. Washington DC: American Society for Microbiology, p. 171-182, 1991.

PFALLER, M. A. – Epidemiological typing methods for mycosis. **Clin. Infect. Dis.**, **14**: S4-S10, 1992.

PFALLER, M. A.; SEGRETI, J. – Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Clin. Infect. Dis.**, **42**: S153-S163, 2006.

PITOUT, J. D. D.; REIBIG, M. D.; VENTER, E. C.; CHURCH, D. L.; HANSON, N. D. – Modification of the double-disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases. **J. Clin. Microbiol.**, **41(8)**: 3933-3935, 2003.

PHILIPPON, A.; LABIA, R.; JACOBY, G. A. – Extended-spectrum beta-lactamases (minireview). **Antimicrob. Agents Chemother.**, **33(8)**: 1131-1136, 1989.

PODSCHUNG, R.; ULLMANN, U. – *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, **11(4)**: 589-603, 1998.

PRADO, M. A.; PIMENTA, F. C.; HAYASHID, M.; SOUZA, P. R.; PEREIRA, M. S.; GIR, E. – Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital brasileiro. **Pan. Am. J. Public Health**, **11(2)**: 93-97, 2002.

PRESTON, K. E.; GRAFFUNDER, E. M.; EVANS, A. M.; VENEZIA, R. A. – Survey of plasmid-associated genetic markers in *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibilities to cephalosporins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47(7)**: 2179-2185, 2003.

QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N.; RODRIGUEZ, M. M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G.; MICROBIOLOGY STUDY GROUP. – Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47(9)**: 2864-2867, 2003.

RAHMAN, M. M.; HAQ, J. A.; HOSSAIN, M. A.; SULTANA, R.; ISLAM, F.; ISLAM, A. H. M. S. – Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **24**: 508-510, 2004.

RASHEED, J. K.; ANDERSON, G. J.; YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; DOMÉNECH-SANCHEZ, A.; SWENSON, J. M.; BIDDLE, J. W.; FERRARO, M. J.; JACOBY, G. A.; TENOVER, F. C. – Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44(9)**: 2382-2388, 2000.

RICE, L. B.; CARIAS, L. L.; HUIJER, A. M.; BONAFEDE, M.; HUTTON, R.; HOYEN, C.; BONOMO, R. A. – High level expression of chromosomally encoded SHV-1  $\beta$ -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44(2)**: 362-367, 2000.

RICHARDS, C.; ALONSO-ECHANOVE, J.; CAICEDO, Y.; JARVIS, W. R. – *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections among neonates in a high-risk nursery in Cali, Colombia. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **25(3)**: 221-225, 2004.

SABATÉ, M.; MIRÓ, E.; NAVARRO, F.; VERGÉS, C.; ALIAGA, R.; MIRELIS, B. PRATS, G. -  $\beta$ -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). **J. Antimicrob. Chemother.**, **49**: 989-997, 2002.

SADER, H. S.; FERREIRA, A. T.; TOSIN, I.; GALES, A. C.; KEIM, L. S.; CARBADILLO, J. M.; MELLO Jr, S. J.; TAVARES, W. – Piperacillin/tazobactam: evaluation of its *In vitro* activity against bacteria isolated in two Brazilian hospitals and an overview of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. **Braz. J. Infect. Dis.**, **2(5)**: 241-255, 1998.

SADER, H. S.; SAMPAIO, J. L. M.; ZOCCOLI, C.; JONES, R. N. – Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial surveillance program in three Brazilian Medical Centers. **Braz. J. Infect. Dis.**, **3(2)**: 63-79, 1999a.

SADER, H. S.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; GALES, A. C.; WINOKUR, P. L.; KUGLER, K. C.; THE SENTRY LATIN AMERICA STUDY GROUP. – Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in Latin America, 1997: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz. J. Infect. Dis.**, **3(3)**: 97-110, 1999b.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. – Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz. J. Infect. Dis.**, **5(4)**: 200-214, 2001.

SADER, H. S.; JONES, R. N.; ANDRADE-BAIOCCHI, S.; BIEDENBACH, D. J.; THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). – Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **44**: 273-280, 2003.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. Jr. –  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.**, **15**: 824-839, 1992.

SANDIUMENGE, A.; DIAZ, E.; RODRIGUEZ, A.; VIDAUR, L.; CANADELL, L.; OLONA, M.; RUE, M.; RELLO, J. – Impact of diversity of antibiotic use on the development of antimicrobial resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, **57**: 1197-1204, 2006.

SAURINA, G.; QUALE, J. M.; MANIKAL, V. M.; OYDNA, E.; LANDMAN, D. – Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. **J. Antimicrob. Chemother.**, **45**: 895-898, 2000.

SCHABERG, D. R.; TOMPKINS, L. S.; FALKOWS, S. – Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. **J. Clin. Microbiol.**, **13**: 1105-1110, 1981.

SCHMITT, J.; JACOBS, E.; SCHMIDT, H. – Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* from patients of two hospitals in Saxony, Germany. **J. Med. Microbiol.**, **56**: 241-249, 2007.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. – Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gel electrophoresis. **Cell**, **37**: 67-75, 1984.

SEIFERT, H.; BOULLION, B.; SHULZE, A.; PULVERER, G. – Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **15**: 520-528, 1994.

SEIFERT, H.; SCHULZE, A.; BAGINSKI, R. PULVERER, R. – Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 1816-1819, 1984.

SILBERT, S.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M. A. – Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **47**: 619-621, 2003.

SIROT, D. – Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. **J. Antimicrob. Chemother.**, **36**, *Suppl. A.*: 19-34, 1995.

SIROT, J.; NICOLAS-CHANOINE, M. H.; CHARDON, H.; AVRIL, J. L.; CATTOEN, C.; CROIX, J. C.; DABERNAT, H.; FOSSE, T.; GHNASSIA, J. C.; LECAILLON, E.; MARMONIER, A.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; SOUSSY, C. J.; TREVOUX, A.; VANDENESCH, F.; DIB, C.; MONIOT-VILLE, N.; REZVANI, Y. – Susceptibility of *Enterobacteriaceae* to  $\beta$ -lactam agents and fluoroquinolones: a 3-year survey in France. **Clin. Microbiol. Infect.**, **8**: 207-213, 2002.

SPANU, T.; LUZZARO, F.; PERILLI, M.; AMICOSANTE, G.; TONIOLO, A.; FADDA, G.; THE ITALIAN ESBP STUDY GROUP. – Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to  $\beta$ -lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **46(1)**: 196-202, 2002.

STEWART, C. D.; RASHEED, J.K.; HUBERT, S. K.; BIDDLE, J. W.; RANEY, P. M.; ANDERSON, G. J.; WILLIAMS, P. P.; BRITAIN, K. L.; OLIVER, A.; MCGOWAN Jr, J. E.; TENOVER, F. C. – Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection methods. **J. Clin. Microbiol.**, **39(8)**: 2864-2872, 2001.

STOBBERINGH, E. E.; ARENDS, J.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; GOESSENS, W. H. F.; VISSER, M. R.; BUITING, A. G. M.; DEBETS-OSENKOPP, Y. J.; VAN KETEL, R. J.; VAN OGTROP, M. L.; SABBE, L. J. M.; VOORN, G. P.; WINTER, H. L. J.; VAN ZEIJL, J. H. – Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in Dutch Hospitals. **Infect.**, **27**: 348-354, 1999.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M. – Molecular typing methods: definition, applications and advantages. In: Persing, D. H.; Smith, T. F.; Tenover, F. C.; White, T. J. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1993. p. 26-50.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. – Interpret chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, **33(9)**: 2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. – How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **18**: 426-439, 1997.

THOMSON, K. S.; SANDERS, C. C. – Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **36(9)**: 1877-1882, 1992.

TONKIC, M.; GOIC-BARISIC, I.; PUNDA-POLIC, V. – Prevalence and antimicrobial resistance of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split, Croatia. **Int. Microbiol.**, **8(2)**: 119-124, 2005.

TORREA, G.; OFFREDO, C.; SIMONET, M. – Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 1043-1049, 1996.

TOWNSEND, D. E.; ASHDOWNS, N.; BOLTON, S.; GRUBB, W. B. – The use of cetyltrimethylammonium bromide for the rapid isolation from *Staphylococcus aureus* of relaxable plasmid DNA suitable for *in vitro* manipulation. **Lett. Appl. Microbiol.**, **1**: 87-94, 1985.

TZELEPI, E.; MAGANA, C.; PLATSOUKA, E.; SOFIANOU, D.; PANIARA, O.; LEGAKIS, N. J.; VATOPOULOS, A. C.; TZOUVELEKIS, L. S. – Extended-spectrum  $\beta$ -

lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **21**: 285-288, 2003.

TUMBARELLO, M.; SPANU, T.; SANGUINETTI, M.; CITTON, R.; MONTUORI, E.; LEONE, F.; FADDA, G.; CAUDA, R. – Bloodstream infections caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **50(2)**: 498-504, 2006.

USP – **The United States Pharmacopeia**. Asian edition. Rockville, Twinbrook Parkway, 2000.

VAN BELKUM, A.; MEIS, J. – Polymerase chain reaction-mediated genotyping in microbial epidemiology. **Clin. Infect. Dis.**, **18**: 1018-1019, 1984.

VERCAUTEREN, E.; DESCHEEMAER, P.; IEVEN, M.; SANDERS, C. C.; GOOSSENS, H. – Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. **J. Clin. Microbiol.**, **35(9)**: 2191-2197, 1997.

VILLEGAS, M. V.; CORREA, A.; PEREZ, F.; MIRANDA, M. C.; ZULUAGA, T.; QUINN, J. P.; THE COLOMBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. – Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **49**: 217-222, 2004.

XIONG, Z.; ZHU, D.; WANG, F.; ZHANG, Y.; OKAMOTO, R.; INOUE, M. – Investigation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from China. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **44**: 195-200, 2002.

WACHSMUTH, K. – Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and investigations of outbreaks. **Rev. Infect. Dis.**, **8**: 682-692, 1986.

WEBER, D. J. – Collateral damage and what the future might hold. The need to balance prudent antibiotic utilization and stewardship with effective patient management. **Int. J. Infect. Dis.**, **10(S2)**: S17-S24, 2006.

WEBER, S.; PFALLER, M. A.; HERWALDT, L. A. – Role of molecular epidemiology in infection control. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, **11**: 257-278, 1997.

WINOKUR, P. L.; CANTON, R.; CASELLAS, J. M.; LEGAKIS, N. – Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. **Clin. Infect. Dis.**, **32, Suppl. 2**: S94-103, 2001.

WU, T. L.; SIU, L. K.; SU, L. H.; LAUDERDALE, T. L.; LIN, F. M.; LEU, H. S.; LIN, T. Y.; HO, M. – Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1  $\beta$ -lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, **47**: 755-761, 2001.

YAMASAKI, K.; KOMATSU, M.; YAMASHITA, T.; SHIMAKAWA, K.; URA, T.; NISHIO, H.; SATOH, K.; WASHIDU, R.; KINOSHITA, S.; AIHARA, M. – Producing of CTX-M-3 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and IMP-1 metallo  $\beta$ -lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. **J. Antimicrob. Chemother.**, **51**: 631-638, 2003.

YAN, J. J.; WU, S. M.; TSAI, S. H.; WU, J. J.; SU, I. J. – Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44(6)**: 1438-1442, 2000.

YU, W. L.; CHUANG, Y. C.; WALTHER-RASMUSSEN, J. – Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, **39**: 264-277, 2006.

## ***12. ANEXOS***

**Anexo I: Ficha para a coleta de dados de pacientes com IH por *Klebsiella pneumoniae*.**

( ) UNICAMP

( ) HMMG

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_

Gênero: ( ) Masculino; ( ) Feminino      Idade: \_\_\_\_\_      Especialidade Médica: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_\_

*K. pneumoniae*: ( ) Infecção Hospitalar; ( ) Infecção comunitária; ( ) Não esclarecida; ( ) Não informado

Sítio de isolamento: \_\_\_\_\_

Situação da cepa:

( ) Cepa viável para análise      ( ) Não houve desenvolvimento      ( ) Cepa não encontrada      Data do isolamento: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Data de admissão: __/__/__	Data da saída: __/__/__	Total de dias: _____
	( ) alta; cura-clínica;	
	( ) transferência;	
	( ) óbito devido à IH;	
	( ) óbito não devido à IH;	

Uso prévio de antibiótico? (antes da data do isolamento): \_\_\_\_\_ ( ) Não; Neutropênico? \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ ( ) Sim;

( ) Penicilina;	( ) Quinolona/fluoroquinolona;	( ) Corticóide
( ) Beta-lactâmico/inibidor de β-lactamase;	( ) Sulfonamida;	( ) Metronidazol
( ) Cefalosporinas;	( ) Macrolídeo;	
( ) Monobactâmico;	( ) Nitrofurantoína;	
( ) Carbapenem;	( ) Glicopeptídeo;	
( ) Aminoglicosídeo;	( ) Fenólico;	

No. total de antibióticos utilizados:	_____
No. de dias sob terapia com antibióticos:	_____

**Fatores de risco:**

- SVD ( ) sim, \_\_\_\_\_ dias; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_
- NPP ( ) sim, \_\_\_\_\_ dias; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_
- Sonda para alimentação enteral ( ) sim, \_\_\_\_\_ dias; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_
- Sonda traqueal ( ) sim, \_\_\_\_\_ dias; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_
- Cateter; Tipo \_\_\_\_\_ ( ) sim, \_\_\_\_\_ dias; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_
- Flebotomia ( ) sim, \_\_\_\_\_ dias; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_
- Ventilação mecânica ( ) sim, \_\_\_\_\_ dias; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_
- Hemoterapia ( ) sim, \_\_\_\_\_ dias; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_
- Cirurgia ( ) sim; \_\_\_\_\_ ( ) não; \_\_\_\_\_

Observações:

Diagnóstico inicial: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Anexo II:** Ficha para coleta de dados, referente aos testes de triagem (detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* possivelmente produtoras de ESBLs).

Cepa:								
	Diâmetro do halo			Provável ESBL?		Sinergismo com AMC?		
Antibiótico	R	I	S	Sim	Não	Antibiótico	Sim	Não
CPD						CPD		
CAZ						CAZ		
ATM						ATM		
CTX						CTX		
CRO						CRO		

Legenda: AMC, amoxicilina com ácido clavulânico; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidima; CPD, cefpodoxima; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; R, resistente; I, intermediário; S, sensível.

**Anexo III:** Ficha para coleta de dados, referente ao teste confirmatório (detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs).

Número da cepa:				
Antibiótico	Diâmetro do halo (mm)		Produtor de ESBL?	
	Sem clavulanato	Com clavulanato	Sim	Não
CAZ				
CTX				

Legenda: CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima.

**Anexo IV:** Preparo de uma suspensão de BaSO<sub>4</sub> equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland (Koneman *et al.*, 2006).

Adicionar 0,5 mL de BaCl<sub>2</sub> 0,48M (1,75%, peso/volume de BaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O) em 99,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36N.

Distribuir um volume de 4-6 mL da suspensão preparada em tubos e armazená-los firmemente vedados, ao abrigo da luz.

## **Anexo V: Variáveis e conceitos**

- a) Alta: autorização médica para a saída do paciente hospitalizado, seja por motivos de cura-clínica ou de transferência para outra instituição;
  
- b) Para o estudo das características clínicas e dos possíveis fatores de risco aos quais os pacientes foram expostos, realizou-se a coleta dos seguintes dados:
  - Gênero (masculino ou feminino);
  - Idade;
  - Uso de ventilação mecânica;
  - Uso de cateter venoso e/ou arterial;
  - Flebotomia (dissecção de veia periférica e inserção de um cateter venoso central);
  - Uso de antibióticos: utilização de antibióticos, seja para finalidades terapêuticas ou profiláticas (considerou-se somente os antibióticos de uso sistêmico);
  - Número total de antibióticos;
  - Tempo de uso da antibioticoterapia;
  - Uso de corticóides;
  - Tempo em uso de corticóides;
  - Presença de drenos;
  - Uso de sonda traqueal;
  - Uso de sonda para alimentação enteral;
  - Uso de sonda nasogástrica;
  - Uso de sonda vesical de demora;
  - Uso de nutrição parenteral total (utilização de nutrição endovenosa, contendo eletrólitos, oligoelementos, glicose, proteínas e lipídeos);
  - Uso de hemoderivados;
  - Realização de cirurgia;
  - Realização de traqueostomia;

Para o tempo de exposição aos diversos procedimentos, o acompanhamento foi realizado desde o momento da internação até a data de isolamento da cepa de *K. pneumoniae*;

c) Data da saída: dia da partida do paciente da instituição, seja por motivos de alta (cura clínica), por motivos de transferência ou por motivos de óbito;

d) *Klebsiella pneumoniae* multirresistente: *K. pneumoniae* resistente a aminoglicosídeos e/ou cefalosporinas de terceira geração;

e) Colonização: presença do microrganismo crescendo e multiplicando-se em um paciente, sem qualquer expressão clínica ou reação imunológica evidentes no momento em que a bactéria foi isolada (Jarvis, 1996);

f) Isolado: termo geral para uma cultura pura de bactérias, obtida a partir de uma subcultura de uma única colônia selecionada de uma placa de isolamento primário; presume-se que o microrganismo em questão seja derivado de uma única bactéria para a qual nenhuma informação sobre seu gênero e sua espécie esteja ainda disponível (Tenover *et al.*, 1995);

g) Isolados epidemiologicamente relacionados: microrganismos obtidos de espécimens coletados de pacientes, de fômites, de um ambiente ou de uma área bem definida, durante um curto período, como parte de uma investigação epidemiológica, sugerindo uma possível origem comum (Tenover *et al.*, 1995);

h) Isolados geneticamente relacionados (clones): isolados que ao serem submetidos a uma variedade de testes genéticos mostram-se indistinguíveis entre si ou muito similares, sugerindo que sejam derivados de um ancestral comum. Considerando o potencial para alterações genéticas crípticas, detectáveis somente pelo sequenciamento ou por outras análises específicas, a evidência da clonalidade deve ser compreendida de forma relativa (Tenover *et al.*, 1995);

i) Surto: incidência aumentada de uma doença infecciosa, em um local específico, durante um certo período, que esteja acima dos índices básicos para aquele local e para aquele período (Tenover *et al.*, 1995);

j) Cepa: microrganismo devidamente isolado, distinguido de outros do mesmo gênero e da mesma espécie por características fenotípicas, por características genotípicas ou por ambas; subdivisão descritiva de uma espécie (Tenover *et al.*, 1995);

l) Cepas de um surto: cepas da mesma espécie apresentando relação epidemiológica, como tempo, lugar e fonte comum de infecção e/ou relação genética, por exemplo, genótipos indistinguíveis (Tenover *et al.*, 1995);

m) Cepas endêmicas: cepas obtidas frequentemente de pacientes infectados, (hospitalizados numa determinada unidade de saúde ou de uma comunidade) apresentando-se indistinguíveis ou intimamente relacionadas entre si, evidenciadas por métodos de tipagem, não existindo, porém, ligação direta ou epidemiológica; sugere-se que tais microrganismos sejam relacionados, sob o ponto de vista clonal, mas suas origens possam ser temporalmente mais distantes quando comparadas às cepas de um surto (Tenover *et al.*, 1995);

n) Cepa repetida: microrganismo da mesma espécie da cepa bacteriana isolada anteriormente, obtido de um outro espécimen clínico do mesmo paciente, durante o período de estudo;

o) Sinergismo: deformação da borda da zona de inibição compreendida entre o disco contendo o antibiótico e o disco contendo a combinação clavulanato mais o antibiótico (Jarlier *et al.*, 1988);

p) Neutropenia: contagem absoluta de neutrófilos abaixo de  $500/\text{mm}^3$  (Kang *et al.*, 2004b);

q) Infecção nosocomial: infecção ocorrida 48 horas após a admissão do paciente no hospital ou infecção ocorrida 48 horas antes da admissão para os pacientes com história de hospitalização prévia nas últimas duas semanas (Kang *et al.*, 2004b);

r) Especialidades médicas: no presente trabalho as diversas especialidades médicas foram categorizadas da seguinte forma:

- Clínica-Médica: compreendeu pacientes das Moléstias Infecciosas, Pronto-Socorro Adulto, Pneumologia, Nefrologia, Enfermaria Geral, Hematologia, Oncologia, Urologia, Endocrinologia, Transplante de Medula Óssea e Ortopedia;

- Clínica-Cirúrgica: compreendeu pacientes da Gastrocirurgia, Cirurgia-Geral, Buco-Maxilo e Traumatologia;

- Neuroclínica;

- Pediatria;

- Unidade de Terapia Intensiva (pacientes adultos e pediátricos);

**Anexo VI:** Interpretação dos valores do diâmetro do halo de inibição para diferentes antibióticos.

Antibiótico	Concentração	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
		R	I	S
Cefem oral Cefpodoxima	10 µg	≤ 17	18-20	≥ 21
Cefem parenteral Ceftazidima	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Monobactâmico Aztreonam	30 µg	≤ 15	16-21	≥ 22
Cefem parenteral Cefotaxima	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Cefem parenteral Ceftriaxona	30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21
Beta-lactâmico com inibidor de beta-lactamase Amoxicilina com ácido clavulânico	20µg/10µg	≤ 13	14-17	≥ 18

Legenda: R, resistente; I, intermediário; S, sensível.  
CLSI, 2005.

**Anexo VII:** Considerações gerais sobre o clavulanato de potássio, de acordo com a farmacopéia americana (USP - *United States Pharmacopeia*, 2000).

Fonte: Produto da fermentação do actinomiceto *Streptomyces clavuligerus*;

Nome químico: 4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-ácido carboxílico, 3-(2-hidroxiethylideno)-7-oxo-,sal monopotássico,[2*R*-(2 alfa, 3*Z*,5 alfa)];

Fórmula molecular: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>KNO<sub>5</sub>;

Peso molecular: 237,25;

Descrição: Pó branco ou esbranquiçado, sensível à umidade;

pKa: 2,7;

Solubilidade: livremente solúvel em água, porém não apresentando boa estabilidade em soluções aquosas; estabilidade ótima em pH de 6,0 a 6,3; solúvel em metanol, com decomposição.

## Anexo VIII - Soluções Utilizadas (dispostas em ordem alfabética).

### ATAB (0,5%)

ATAB.....	2,5 g
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	500 mL

### ATAB (0,5%); TRITON X-100 (0,25%)

ATAB.....	2,5 g
TRITON X-100.....	1,25 mL
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	500 mL

### ATAB (0,5%); TRITON X-100 (1%)

ATAB.....	2,5 g
TRITON X-100.....	5 mL
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	500 mL

### Brometo de etídio (0,5 µg/mL)

Solução estoque (20 mg/mL).....	40 µL
Água Destilada.....	1600 mL

### Cloreto de Magnésio (1M)

MgCl <sub>2</sub> .....	20,33 g
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	100 mL

Filtrar. Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm). Armazenar a 4°C.

### Dummy No Salt Buffer

Solução estoque		Concentração final
TRIS (1M; pH 8).....	5 mL.....	0,1 M
Cloreto de Magnésio (1M).....	250 µL.....	0,005 M
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	50 mL	

### EC Buffer

Solução estoque		Concentração final
TRIS (1M; pH 7,5).....	1500 µL.....	0,006 M
NaCl (5M).....	50 mL.....	1 M
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	50 mL.....	0,1 M
BRIJ 58.....	1,25 g.....	0,5%
Deoxycholate Na.....	500 mg.....	0,2%
N-Lauroylsarcosine.....	1,25 g.....	0,5%

**Não autoclavar.** Ajustar o pH com lentilhas de NaOH e completar o volume para 250 mL. Filtrar (papel filtro e funil).

### EDTA (0,5M; pH 7,5-8,0)

EDTA.....	186,1 g
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	1000 mL

Agitar acrescentando pérolas de NaOH. Atingido o pH desejado, completar a solução com água destilada (qsp 1000 mL). Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm).

**EDTA (0,625M; pH 9,3)**

EDTA.....	116,3 g
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	500 mL

Adicionar o EDTA em aproximadamente 300 mL de água destilada e lentilhas de NaOH. Havendo a solubilização, ajustar o pH e completar o volume para 500 mL. Autoclavar.

**ESP - Solução para 10 cepas**

(preparar somente o volume suficiente para o uso no ensaio)

<b>Solução estoque</b>	<b>Concentração final</b>
EDTA 0,625 M (pH 9,3)..... 16 mL.....	0,5 M
N-Laurosylysarcosine 5%..... 4 mL.....	1%
Proteinase K (20 mg/mL)..... 100 µL.....	0,1 mg/mL
Volume total.....	20 mL

**Gel de Agarose 1% com TBE 0,5X (gel grande)**

TBE 5X.....	15 mL
Agarose Ultra Pura Grau Cromossômico.....	1,5 g
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	135 mL

**Lisozima 20 mg/mL**

Lisozima.....	20 mg
dH <sub>2</sub> O Estéril.....	1 mL

Aliquotar em tubos *Eppendorf* estéreis. Armazenar em *freezer*.

**Low Melt Agarose (2%)**

Low Melt Agarose.....	0,5 g
Água Destilada.....	25 mL

Aquecer em microondas e dispensar 5 mL em tubos cônicos de 10 mL.

**NaCl (5,0 M)**

NaCl.....	292,2 g
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	1000 mL

Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm). Armazenar a 4°C.

**NaCl (2,5M); EDTA (10 mM; pH 7,9-8,0)**

NaCl (5M).....	250 mL
EDTA (0,5M; pH 8,0).....	10 mL
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	500 mL

Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm). Armazenar a 4°C.

**Padrão de peso molecular (utilizado na análise plasmidial)**

<i>Supercoiled DNA Ladder</i> (GibcoBRL).....	3 µL
TE High Molarity.....	17 µL
Corante.....	5 µL

**Sacarose 20% + TRIS (50 mM) + EDTA (10 mM)**

Sacarose.....	100 g
TRIS (1M; pH 8,0).....	25 mL
EDTA (0,5M; pH 8,0).....	10 mL
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	500 mL

Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm). Armazenar a 4°C.

**Tampão EC (EC Buffer) pH 7,5**

<b>Solução estoque</b>	<b>Concentração final</b>
TRIS (1 M; pH 7,5)..... 1500 µL.....	0,006 M
NaCl (5 M)..... 50 mL.....	1 M
EDTA (0,5 M; pH 7,5)..... 50 mL.....	0,1 M
BRIJ 58..... 1,25 g.....	0,5 %
Deoxycholate Na..... 500 mg.....	0,2 %
N-Lauroylsarcosine..... 1,25 g.....	0,5 %
dH <sub>2</sub> O (qsp)..... 250 mL	

Ajustar o pH com pérolas de NaOH. Completar o volume com água destilada. Filtrar a solução. **Não autoclavar.**

**Tampão TBE 0,5 X com tiouréia 25 mM**

TBE 5X.....	200 mL
Tiouréia 0,25M.....	200 mL
dH <sub>2</sub> O.....	1600 mL

**Tampão TEN (TEN Buffer)**

<b>Solução estoque</b>	<b>Concentração final</b>
TRIS (1 M; pH 7,5)..... 5 mL.....	100 mM
EDTA (0,5 M; pH 7,5)..... 10 mL.....	100 mM
NaCl (5 M)..... 1,52 mL.....	150 mM
dH <sub>2</sub> O (qsp)..... 50 mL	

**TBE 0,5 X**

TBE 5 X.....	100 mL
dH <sub>2</sub> O.....	900 mL
Volume total.....	1000 mL

**TBE 1 X**

TBE 5 X.....	200 mL
dH <sub>2</sub> O.....	800 mL
Volume total.....	1000 mL

**TBE 5 X**

Trizma Base.....	54 g
Ácido Bórico.....	27,5 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0).....	20 mL
dH <sub>2</sub> O.....	1000 mL

**TE (TRIS 0,1 M, pH7,5; EDTA 0,1 M; pH 7,5)**

TRIS (1M; pH 7,5).....	5 mL
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	10 mL
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	50 mL

Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm). Armazenar a 4°C.

**TE High Molarity (TRIS 0,1M, pH 7,5; EDTA 0,1 M, pH 7,5)**

<b>Solução estoque</b>		<b>Concentração final</b>
TRIS (1M; pH 7,5 -8,0).....	50 mL.....	0,1 M
EDTA (0,5M; pH 8,0).....	100 mL.....	0,1 M
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	500 mL	

Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm). Armazenar a 25°C.

**TEN BUFFER**

<b>Solução estoque</b>		<b>Concentração final</b>
TRIS (1M; pH 7,5).....	5 mL.....	100 mM
EDTA (0,5M; pH 7,5).....	10 mL.....	100 mM
NaCl (5M).....	1,52 mL.....	150 mM
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	50 mL	

Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm). Armazenar a 4°C.

**Tiouréia 0,25 M**

Tiouréia.....	3,8 g
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	200 mL

**TRIS (1M; pH 7,5-8,0)**

TRIS.....	60,6 g
dH <sub>2</sub> O (qsp).....	500 mL

Autoclavar por 15 minutos (121°C; 1 atm). Armazenar a 4°C.

**TRIS (0,02 M); EDTA (0,01 M)**

TRIS (1 M; pH 7,5).....	1 mL
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	1 mL
Volume total.....	50 mL

## Anexo IX: Fatores de risco envolvendo infecção por *Klebsiella pneumoniae* em trabalhos internacionais.

Fator de risco para:	Local	Adulto vs Pediátrico	População	Desenho do estudo	Material clínico	Período	Resultado – Análise multivariada (estatisticamente significante)	Referência
Infecção por <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp produtores de ESBL	Espanha	Adulto	Todos	Estudo retrospectivo	Sangue	Janeiro 2003- Dezembro 2005	-Isolamento prévio de um microrganismo produtor de ESBL; -Doença de base em quadro fatal; -Transplante renal; -Uso prévio de cefalosporina e carbapenêmicos.	Martínez <i>et al.</i> , 2006
Isolamento de <i>K. pneumoniae</i> produtores de ESBL em corrente sanguínea	Itália	Adulto	Todos	Caso-controle	Sangue	Janeiro 1999- Dezembro 2003	-Idade; -Tempo de hospitalização; -Terapia antimicrobiana prévia;	Tumbarello <i>et al.</i> , 2006
Isolamento de <i>K. pneumoniae</i> não-produtores de ESBL em corrente sanguínea	Itália	Adulto	Todos	Caso-controle	Sangue	Janeiro 1999- Dezembro 2003	-Tempo de hospitalização; -Infecção prévia do trato urinário;	Tumbarello <i>et al.</i> , 2006
Mortalidade relacionada à bacteremia	Brasil	Adulto	Todos	Estudo retrospectivo	Sangue	Janeiro 1996- Maio 2001	-Ventilação mecânica; -Número de comorbidades; -Antimicrobianos prescritos antes da bacteremia; -Doença de base fatal	Marra <i>et al.</i> , 2006b
Aquisição de cepas de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL	Israel	Adulto	Todos	Estudo retrospectivo	Urina	Janeiro 2003- Outubro 2003	-Anemia; -Cateter permanente urinário; -Uso prévio de antibiótico (em especial fluoroquinolonas)	Mendelson <i>et al.</i> , 2005
Para microrganismos produtores de ESBL ( <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp)	Líbano	Adulto	Todos	Caso-controle	Múltiplo	Julho 2003- Outubro 2003	-Uso prévio de antibióticos; -Cirurgia recente; -Cateter urinário; -Ventilação mecânica;	Kanafani <i>et al.</i> , 2005
Para mortalidade	Líbano	Adulto	Todos os pacientes-caso	Caso-controle	Múltiplo	Julho 2003- Outubro 2003	-Falência renal crônica; -Presença de cateter urinário; -Presença de cateter central; -Diabetes mellitus; -Admissão na UTI; -Necessidade de ventilação mecânica;	Kanafani <i>et al.</i> , 2005
Para mortalidade	Líbano	Adulto	Todos os pacientes-controle	Caso-controle	Múltiplo	Julho 2003- Outubro 2003	-Falência renal crônica	Kanafani <i>et al.</i> , 2005
Para resistência a multidrogas ( <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp)	EUA	Adultos	Todos	Caso-controle	Múltiplo	Junho 1997- Dezembro 2002	-Microrganismo infectante ( <i>K. pneumoniae</i> )	Hyle <i>et al.</i> , 2005
Aquisição de <i>K. pneumoniae</i>	Coréia	Adulto	UTI-	Caso-	Escarro	Outubro	-Exposição prévia	Lee <i>et al.</i> ,

<i>pneumoniae</i> produtores de ESBL			neurocirúrgica	controle			2002- Fevereiro 2003	às cefalosporinas de terceira geração; -Hemorragia intraventricular;	2004
Para mortalidade	Coréia	Adultos	Todos	Estudo retrospectivo	Sangue	Janeiro1998- Dezembro2002		-Sepse severa; -Peritonite; -Neutropenia; -APACHE II elevado; -Administração de cefalosporinas de amplo espectro como terapia antimicrobiana definitiva	Kang <i>et al.</i> , 2004(a)
Infecção em corrente sanguínea	Coréia do Sul	Adulto	Todos	Caso-controle	Sangue	Janeiro1998- Abril 2002		-Cateterização urinária; -Procedimento invasivo nas 72 horas prévias ao isolamento; -Aumento no número de antibióticos administrados nos 30 dias prévios	Kang <i>et al.</i> , 2004(b)
Mortalidade	Coréia do Sul	Adulto	Todos	Caso-controle	Sangue	Janeiro1998- Abril 2002		-Peritonite; -Cuidados de UTI; -Índice APACHE II elevado; -Terapia antimicrobiana definitiva ineficaz; -Apresentação clínica de choque séptico;	Kang <i>et al.</i> , 2004(b)
Aquisição de cepa-surto (infecção ou colonização)	EUA	Neonatos	UTI-neonatal	Caso-controle	Espécimens do trato gastrintestinal; das mãos dos funcionários; do ambiente	Abril2001- Junho2001		-Tempo de permanência; -Exposição aos cuidados dos profissionais usando luvas artificiais;	Grupta <i>et al.</i> , 2004
Infecção por <i>K. pneumoniae</i> em corrente sanguínea	Colômbia	Neonatos	Enfermaria de alto risco	Estudo retrospectivo	Sangue	6/02/1999- 06/03/1999		-Número de transfusões sanguíneas; -Injeções intravenosas	Richards <i>et al.</i> , 2004
Infecção por cepas produtoras de ESBL ( <i>E. coli</i> ; <i>Klebsiella</i> spp)	Israel	Adultos	Pacientes não hospitalizados	Estudo retrospectivo	Urina	Dois anos		-Hospitalização prévia nos 3 meses precedentes; -Tratamento com antibióticos nos últimos 3 meses; -Idade superior a 60 anos; -Diabetes; -Gênero masculino; -Infecção por <i>K. pneumoniae</i> ; -Uso prévio de: cefalosporinas de terceira geração;	Colodner <i>et al.</i> , 2004

								cefalosporinas de segunda geração; quinolonas e penicilinas;	
Aquisição de cepas de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL	Taiwan	Adulto	Todos	Caso-controle	Múltiplo	Maio 2001-Setembro 2001		-Traqueostomia; -Uso de ceftazidima	Lin <i>et al.</i> , 2003
Bacteremia nosocomial por cepas de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL	China	Adulto	Todos	Estudo retrospectivo	Sangue	Janeiro 1997-Dezembro 1999		-Tratamento prévio com cefalosporina de terceira geração	Du <i>et al.</i> , 2002
Infecção por <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> produtores de ESBL	EUA	Adulto	Todos	Caso-controle	Múltiplo	01/06/1997-31/05/1998		-Duração da antibioticoterapia	Lautenbach <i>et al.</i> , 2001
Ocorrência de cepas de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL	EUA	Adulto	Todos	Estudo retrospectivo	Múltiplo	Mês de novembro 1997		-Uso de cefalosporina mais aztreonam;	Saurina <i>et al.</i> , 2000
Isolamento de <i>K. pneumoniae</i> produtores de ESBL	França	Adulto	Neuroclínica	Caso-controle	Urina, pus	Janeiro 1992-Dezembro 1996		-Tempo de permanência hospitalar; -Grau de má-nutrição e dependência; - <i>Status</i> do esfíncter urinário; -Tipo de alimentação (oral ou enteral)	Mangeny <i>et al.</i> , 2000