

**Universidade Católica de Goiás  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde**

**Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae*  
isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com  
infecção nosocomial**

**DANIELLA FABÍOLA DOS SANTOS**

**Goiânia - Goiás  
Fevereiro de 2007**

**Universidade Católica de Goiás**  
**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**  
**Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde**

**Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae*  
isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com  
infecção nosocomial**

**DANIELLA FABÍOLA DOS SANTOS**

**Orientador: Dr. José Rodrigues do Carmo Filho**

**Co-orientadora: Dra. Fabiana Cristina Pimenta**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Ambientais e Saúde, da Pró - Reitoria de Pós  
- Graduação e Pesquisa da Universidade  
Católica de Goiás, como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Ambientais e Saúde.**

**Goiânia – Goiás**  
**Fevereiro de 2007**

**Universidade Católica de Goiás**  
**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**  
**Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde**

**Dissertação do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde defendida em  
26 de fevereiro de 2007 e considerada Aprovada pela banca examinadora:**

**Presidente: Dr. José Rodrigues do Carmo Filho**

**Membro convidado: Dra. Ana Cristina Gales**

**Membro: Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer**

S237c Santos, Daniella Fabíola dos.

Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial / Daniella Fabíola dos Santos. – 2006.

65 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, 2006.

“Orientador: Dr. José Rodrigues do Carmo Filho”.

“Co-orientador: Dra. Fabiana Cristina Pimenta”.

1. Enzima. 2. B-lactamases. 3. *Klebsiella pneumoniae*.  
4. Bactéria – resistência. I. Título.

CDU: 616-022

579

## **Dedicatória**

A minha mãe Francisca, pelos exemplos de moral e de valores humanos vivenciados desde meus primeiros anos de vida.

Ao meu pai Divino, pelo exemplo de determinação e pelo estímulo e apoio para que pudesse fazer mais esta conquista.

Aos meus irmãos Débora e Thiago pelo carinho e pela amizade que nos unem.

Aos meus sobrinhos Bernardo e Estevão pela ternura que trazem a minha vida.

Ao meu filho Augusto, meu grande tesouro! Obrigada pela companhia durante os momentos mais inquietantes e por dar sentido a toda luta e aos esforços para o meu aprimoramento pessoal.

Dedico este trabalho ainda a todos que acreditaram em mim e no crescimento trazido por este estudo.

## **Agradecimentos**

À Deus que me deu forças e esperança para superar tantos obstáculos e alcançar esta meta.

Ao Dr. José Rodrigues pela competência e dedicação na orientação desse trabalho.

À Dra. Fabiana Pimenta pelo apoio e desprendimento de seu tempo para contribuir com este estudo.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Clínica da Santa Casa de Misericórdia, em especial à Wanderleia Martins e à Sione Oliveira pelo auxílio na coleta das amostras e pela gentileza com que sempre me auxiliaram.

Às equipes dos Laboratórios dos Hospitais Araújo Jorge e do Hospital das Clínicas que também gentilmente nos forneceram as amostras.

A bolsista Daniela Braz dos Santos e ao colega Rodrigo Alves pela dedicação e auxílio durante os experimentos.

À biomédica Edlaine Rodrigues Montalvão do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Católica de Goiás pelo auxílio durante a realização dos testes laboratoriais.

Aos funcionários do Mestrado Carlos Eduardo Lopes e Camilla Di Ribeiro Barbosa.

As amigas de Pós-graduação Alessandra Regina Brito Auad e Héliida Carla Gomes pela paciência e incentivo durante a realização deste estudo.

Ao meu irmão Thiago pelo apoio na formatação deste trabalho.

A minha família, peça fundamental nessa empreitada. Obrigada por este amor incondicional!

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	AGENTE ETIOLÓGICO .....	13
1.2	EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES HOSPITALARES CAUSADAS POR <i>K. PNEUMONIAE</i> .....	15
1.3	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE <i>K. PNEUMONIAE</i> AOS ANTIMICROBIANOS .....	18
1.3.1	<i>Redução da afinidade pelos alvos da droga (PBPs)</i> .....	19
1.3.2	<i>Alteração da permeabilidade da membrana externa</i> .....	20
1.3.3	<i>Degradação da droga</i> .....	21
1.3.3.1	$\beta$ -lactamases.....	21
1.3.3.1.1	Classificação das $\beta$ -lactamases.....	23
1.3.3.1.2	$\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL).....	24
1.3.3.1.2.1	SHV.....	26
1.3.3.1.2.2	TEM.....	28
1.3.3.1.2.3	CTX-M.....	29
1.3.3.1.3	Metalo-Betalactamases (MBL).....	30
1.3.3.2	Amp C betalactamase .....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>35</b>
3.1	INVESTIGAÇÃO MICROBIOLÓGICA .....	35
3.1.1	<i>Amostras bacterianas</i> .....	35
3.1.2	<i>Identificação bacteriana</i> .....	35
3.1.3	<i>Avaliação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos</i> .....	35
3.1.4	<i>Identificação fenotípica das cepas de Klebsiella pneumoniae produtoras de ESBL</i> .....	36
3.2	ELETOFORESE EM CAMPO ELÉTRICO PULSADO (PFGE) .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>KLEBSIELLA</i> SPP. POR CENTRO PARTICIPANTE DO PROGRAMA DE VIGILÂNCIA DE RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	40
4.2	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE <i>KLEBSIELLA</i> SPP. POR SÍTIO DE ISOLAMENTO .....	41
4.3	PREVALÊNCIA DE AMOSTRAS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> PRODUTORAS DE ESBL.....	42
4.4	PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS <i>IN VITRO</i> DAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE <i>KLEBSIELLA</i> SPP. EM TRÊS CENTROS PARTICIPANTES .....	44
4.5	AValiação da variedade genética das amostras de <i>K. PNEUMONIAE</i> PRODUTORAS DE ESBL COLETADAS NO HOSPITAL C .....	49
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO: ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA TRABALHO, EDUCAÇÃO E SAÚDE/FIOCRUZ</b> .....	<b>82</b>

“Quanto mais forem os vossos conhecimentos, mais fáceis e mais perfeitas serão as vossas obras”. Charles Kingslev



## LISTA DE ABREVIATURAS

AMI	Amicacina
AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
AST	Ampicilina/sulbactam
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CC	Clínica Cirúrgica
CFT	Cefalotina
CFZ	Cefazolina
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CM	Clínica Médica
CPM	Cefepima
CPD	Cefpodoxima
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
ESBL	$\beta$ -lactamase de espectro ampliado
GAT	Gatifloxacina
GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
LAMIC	Laboratório de Microbiologia Clínica do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

LEV	Levofloxacina
MBL	Metalo- $\beta$ -lactamase
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilinas
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PI	Ponto isoelétrico
PIP	Piperacilina
PIP/TAZ	Piperacilina/Tazobactam
TIM	Ticarcilina/ácido clavulânico
TOB	Tobramicina
TRS	Trimetropina/sulfametoxazol
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

## RESUMO

*Klebsiella pneumoniae* é importante agente etiológico de infecções no meio ambiente hospitalar e o uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente cefalosporinas de terceira geração, produz pressão seletiva que favorece a proliferação de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs). Estas enzimas hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, mas são sensíveis aos inibidores de  $\beta$ -lactamases. As ESBLs já foram identificadas em outros patógenos, mas são encontradas principalmente em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. As falhas na detecção de ESBL aumentam as taxas de morbidade, de mortalidade, favorece a ocorrência de surtos por organismos multirresistentes aos antibióticos e aumentam os custos hospitalares. Os objetivos do estudo foram avaliar a prevalência, o perfil de sensibilidade e a variedade genética de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL no hospital com prevalência elevada de infecções causadas por este microrganismo em Goiânia. Foram avaliadas 61 amostras de *Klebsiella pneumoniae* (89,9%) e 7 de *Klebsiella oxytoca* (10,1%) isoladas de janeiro de 2005 a maio de 2006 de pacientes hospitalizados em três hospitais de Goiânia. Todos os isolados foram identificados e testados quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos por meio do método automatizado semi-quantitativo (MicroScan WalkAway® - Dade Behring, USA). O teste de difusão dupla em disco foi utilizado para detectar as amostras produtoras de ESBL. Um disco contendo amoxicilina/clavulanato foi usado como inibidor de  $\beta$ -lactamase e posto a 20 mm do oximino- $\beta$ -lactâmico. O aumento da zona de inibição do oximino- $\beta$ -lactâmico causado pelo clavulanato evidenciou a produção ESBL. A tipagem das amostras produtoras de ESBL do Hospital C foi realizada pelo método *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). A prevalência de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL foi elevada (25%, 28,5% e 66,7% respectivamente) e as taxas de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos foram maiores entre isolados produtores de ESBL. Somente o imipenem teve atividade ótima *in vitro*. A análise do DNA cromossomal das cepas mostrou uma variedade genética em 5 amostras (natureza multiclonal) e similaridade entre 6 (natureza clonal) produtoras de ESBL.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* is an important ethiological agent of infections in the nosocomial environment and due to indiscriminate use of broad spectrum antimicrobials, especially of third generation cephalosporins; a selective pressure is produced, what favors the growth of strains producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). These enzymes hydrolyse broad spectrum cephalosporins and monobactams, but are inhibited by  $\beta$ -lactamases inhibitors. ESBLs have been identified in other pathogens but are more often found in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. The fails in the detection of ESBL increase the mortality and morbidity rates, favors the occurrence of multiresistant drug outbreaks and increase the costs to control these microorganisms. The purpose of this study was to evaluate the prevalence, susceptibility to antimicrobial agents and genomic variability of ESBL *Klebsiella pneumoniae* in the hospital with the highest prevalence of ESBL producing isolates in Goiânia. A total of 61 strains of *Klebsiella pneumoniae* (89,9%) and 7 of *Klebsiella oxytoca* (10,1%) were isolated from January 2005 to May 2006 from hospitalized patients in three hospitals in Goiânia. All the isolates were identified and the susceptibility to antimicrobials tested by the automated semiquantitative method (MicroScan WalkAway® - Dade Behring, USA). The double-disk diffusion was used to detect the ESBL producing strains; a disk containing amoxicillin/clavulanate was placed as the inhibitor of  $\beta$ -lactamase 20mm from the oxymino- $\beta$ -lactam. Enhancement of the zone inhibition of the oxymino  $\beta$ -lactam caused by the clavulanate disk was considered as evidence of ESBL production. The chromosomal DNA analysis was performed by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The prevalence of ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* was high (25%, 28.5% and 66.7% respectively) and the antimicrobial resistance rates were higher among ESBL producing isolates. Only the imipenem showed excellent activity *in vitro*. The chromosomal DNA analysis showed a great variability among 5 strains (multiclinal) and similarity among 6 strains (clonal) producing ESBL.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Agente etiológico

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grupo grande e heterogêneo de bactérias gram-negativas. Os principais gêneros desta família são *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Hafnia* (Rollins & Joseph, 2000).

O gênero *Klebsiella* foi assim designado por Trevisan em 1885, em homenagem a Edwin Klebs, microbiologista alemão. Trevisan também foi responsável pela descrição da espécie *K. pneumoniae* (Umed, 2002; Martinez et al, 2004). Historicamente a classificação das espécies de *Klebsiella* foi baseada em suas características patogênicas ou quanto a sua origem. Posteriormente foram classificadas de acordo com suas características relativas à utilização do substrato e atividades das enzimas. Finalmente, os estudos de biologia molecular permitiram a identificação de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia deste gênero. O gênero *Klebsiella* foi definido por sequenciamento do ácido desoxirribonucléico (DNA) e permitiu a identificação de cinco espécies: *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*, *K. mobilis* e *K. pneumoniae*. Esta última é subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*. Entre as três subespécies de *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é a mais frequente (Podschun & Ullmann, 1998; Umed, 2002; Martínez et al, 2004).

*K. pneumoniae* é um bastonete gram-negativo aeróbio facultativo, mas com melhor crescimento em condições aeróbias, não esporulado e cujo tamanho varia de 0,3 a 1  $\mu$  de diâmetro e 0,6 a 6 $\mu$  de comprimento, é imóvel, produz colônias grandes e gomosas quando cultivadas em placas com nutrientes. No ágar MacConkey, produz colônias róseas, brilhantes, com aspecto elevado e de consistência mucóide. As colônias formadas são grandes devido à cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K) que protege contra a fagocitose por granulócitos, contra a ação de fatores bactericidas do soro e ainda tem função de auxiliar na aderência (Umed, 2002; Martínez et al, 2004).



**FIGURA 1:** Isolado de *Klebsiella pneumoniae* em ágar Mac Conkey.

O gênero *Klebsiella* possui características bioquímicas que permitem sua identificação. Possui reação de oxidase negativa, fermenta glicose, reduz nitrato, lisina positiva, citrato e indol negativos, tríplice açúcar ferro (TSI) positivo com produção de gás, ornitina negativa, metaboliza a lactose, utiliza o citrato como fonte de carbono e também hidrolisa a uréia, formando gás ou não. A maioria das amostras é capaz de produzir o butilenoglicol como produto final da fermentação da glicose (Podschun et al, 1992; Gales, 1997; Koneman et al, 2001).

Os microrganismos deste gênero são encontrados em quase todos os ambientes naturais (solo, água e plantas). O gênero *Klebsiella* inicialmente foi isolado em plantas e não era associado a infecções. Entretanto, já foram descritos isolados clínicos de *K. planticola* relacionados às infecções causando sepse. As cepas isoladas de *K. planticola* e *K. pneumoniae* foram isoladas de arroz e outras espécies de plantas sendo, contudo a maioria dos isolados clínicos pertencentes às espécies *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *K. granulomatis* (Rollins & Joseph, 2000).

*K. pneumoniae*, por sua vez, foi isolada da boca de indivíduos com ou sem doença periodontal e em orofaringe de portadores assintomáticos. A colonização da orofaringe é fonte de infecções pulmonares em pacientes debilitados por alcoolismo, diabetes e portadores de doenças pulmonares crônicas. As infecções causadas por *Klebsiella* spp. tendem a ocorrer em pessoas com sistema imunitário deprimido sendo responsável por alta taxa de mortalidade. Dentre as síndromes clínicas mais freqüentes citam-se: pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse (Madson et al 1994; Ingham, 2000; Umed, 2002).

A colonização do trato gastrintestinal por *Klebsiella* ocorre em todas as pessoas e constituem importantes fontes de transmissão. Estudos têm demonstrado que pelo menos 80% dos pacientes com infecção por *K. pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL) tiveram infecções precedidas pela colonização do trato gastrintestinal. Desta forma, deve-se considerar a tomada de precauções de contato para evitar que pacientes colonizados transmitam este mecanismo de resistência a outros pacientes (Shlaes, 1997; Piroth et al, 1998; Paterson e Bonomo, 2005).

A patogenicidade da *Klebsiella* spp. pode ser atribuída à produção de enterotoxina estável ao calor; à habilidade de metabolizar a lactose; à presença de cápsula ou lipopolissacarídeo; à presença de adesinas com ou sem fímbrias que favorece sua adesão às mucosas, às células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para produzir o processo infeccioso e proteger a bactéria dos fatores bactericidas do soro acompanhado pela inibição da ativação dos componentes do complemento. A maioria dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* é encapsulada e adere *in vitro* a células intestinais com padrão agregativo. Estudos observaram que *K. pneumoniae* produtoras de ESBL do tipo SHV-4, possuem adesinas fimbriais do tipo KPF-28 (Madson et al, 1994; Podschun & Ullmann, 1998; Umed, 2002). A habilidade das *K. pneumoniae* produtoras de ESBL de escapar da atividade fagocítica dos polimorfonucleares neutrófilos pode ser responsável pelo grande potencial patogênico destas bactérias (Sahly et al, 2002).

## **1.2 Epidemiologia das infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae***

*K. pneumoniae* é importante causa de infecções relacionadas à assistência à saúde, tanto no meio ambiente comunitário quanto no hospitalar. O número de surtos hospitalares causados por *K. pneumoniae* é cada vez maior com a mudança no padrão de sensibilidade aos antimicrobianos. Sua transmissão ocorre por contato direto ou por fonte comum podendo ocorrer em qualquer área física hospitalar e acometer pacientes clínicos, cirúrgicos e pediátricos (Marra, 2002).

A prevalência das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL varia conforme o país, a instituição de saúde e o sítio de isolamento.

A diversidade topográfica das infecções por *Klebsiella* spp. possivelmente resulta das características da bactéria; das características dos hospedeiros tais como, depressão do sistema imunitário causadas por *diabetes mellitus* ou alcoolismo aumentando as chances de infecções mais graves; fatores sócio-econômicos e possivelmente a suscetibilidade genética em diferentes grupos raciais (Bradford, 2001). Um estudo realizado por Paterson et al, 2001 mostrou que as diferenças fenotípicas e genotípicas em *K. pneumoniae* eram responsáveis por manifestações de doenças como meningite bacteriana em adultos e abscessos no fígado. Na Europa a prevalência da produção de ESBL entre isolados de *Enterobacteriaceae* varia de país para país; nos países baixos menos de 1% de *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* são produtoras de ESBL. Na França 40% dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL eram resistentes a ceftazidima. No Japão a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos ainda é baixa: menos de 0,1% das *E. coli* e 0,3% das *K. pneumoniae* são produtoras de ESBL. Na Ásia as porcentagens de produção de ESBL em *E. coli* e *K. pneumoniae* variam de 4,8% na Coreia a 8,5% em Taiwan e mais de 12% em Hong Kong (Bradford, 2001). Na Etiópia a ocorrência de *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL e a resistência às múltiplas drogas foram identificadas em um estudo, o qual demonstrou que 94,7% das amostras eram resistentes à cefalosporina e dentre estas 67% apresentaram altos níveis de resistência a múltiplas drogas (Philippon et al, 1989).

Na América Latina, a prevalência de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL é bem maior que a média mundial, que varia entre 20 e 30% (Jones, 2000). Um estudo de vigilância epidemiológica (Programa de Vigilância Resinet em 1998) envolvendo 10 países da América Central e do Sul identificou uma prevalência variável de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL: 26% no Equador, 73% no Chile, 65% no Peru, 7% na Venezuela, 56% no México, 52% na Guatemala, 26% no Equador e 44% na Colômbia. Muito embora o estudo tenha demonstrado que a prevalência de *K. pneumoniae* no Brasil é de 38%, ainda não existe um estudo demonstrando esta prevalência em todas as regiões do país (Sifuentes - Osornio, 2000).

Os estudos brasileiros são limitados a poucas cidades, principalmente as da região sudeste. No Hospital São Paulo, hospital escola da Universidade Federal de São Paulo, alguns estudos foram desenvolvidos e puderam



demonstrar que a prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foi de 39% (Gales, 1997); em outro estudo Marra (2002) constatou que 39% das cepas de *K. pneumoniae* isoladas da corrente sanguínea eram produtoras de ESBL. Neste mesmo hospital, Carmo Filho (2003) demonstrou que a prevalência de infecções causadas por *K. pneumoniae* em Unidade de Tratamento Intensivo Geral de paciente adulto foi de 31% e destas 69% eram produtoras de ESBL e na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal do mesmo hospital a prevalência de infecção hospitalar causada por *K. pneumoniae* foi de 53,8% e destas 46,2% eram produtoras de ESBL.

Por meio de um programa de vigilância de resistência bacteriana de abrangência mundial denominado SENTRY, identificaram taxas muito maiores de resistência entre os bastonetes gram-negativos na América Latina que em outras regiões do continente estudadas e o principal mecanismo de resistência identificado foi a produção de ESBL. Das *Klebsiella* spp. isoladas de amostras coletadas na América Latina 47,3% eram produtoras de ESBL. Em outro estudo também realizado pelo SENTRY envolvendo 11 hospitais brasileiros foram encontradas 50 (9,5%) amostras de *Klebsiella* spp. das 525 amostras estudadas (Sader et al, 2002).

As infecções hospitalares comprometem o quadro clínico de pacientes hospitalizados, notadamente dos que estão em tratamento nas UTIs. *Klebsiella* spp. é um patógeno oportunista isolado predominantemente de indivíduos hospitalizados, imunodeprimidos e que possuem doenças de base como *diabetes mellitus* ou obstrução pulmonar crônica. As infecções da corrente sanguínea são causadas mais frequentemente por bactérias gram-positivas enquanto que nas infecções pulmonares e urinárias predominam as bactérias gram-negativas. Dentre os agentes patogênicos relacionados com as infecções hospitalares, *Klebsiella* spp. tem alta prevalência e podem causar infecções em qualquer sítio. Entretanto, as freqüências das infecções causadas por *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL variam também quanto ao sítio de isolamento sendo esta bactéria o agente etiológico mais frequentemente isolado em infecções respiratórias notadamente em pacientes internados em UTIs. Nestas unidades, *K. pneumoniae* é responsável por 14% das bacteremias primárias, 10% do total de infecções da corrente sanguínea, 29% dos casos de sepse, 45% das infecções de feridas, 6-8% das

pneumonias comunitárias e 28% do total de todas as pneumonias (Pittet et al, 1995; Marra, 2002; Paterson et al, 2003).

A importância clínica deste patógeno no ambiente hospitalar foi demonstrada pela ocorrência de surtos causados sobretudo por *K. pneumoniae* produtora de ESBL que ocorreram inicialmente na Europa, nos EUA, na Ásia e na América do Sul. Os surtos causados por este microrganismo produtor de ESBL geralmente decorrem de transferências de pacientes entre unidades de internação e/ou entre hospitais ou podem estar associados ao uso abusivo de  $\beta$ -lactâmicos que poderão exercer pressão seletiva favorecendo o crescimento de cepas produtoras de ESBL (Heritage et al, 1999; Paterson et al, 2003).

Dentre os microrganismos produtores de ESBL *Klebsiella* é o gênero que produz a maior variedade destas enzimas, o que poderia ser explicado pelo fato destes microrganismos serem bons vetores para plasmídeos ou por permitirem a evolução de genes que codificam ESBL mais rapidamente que outras *Enterobacteriaceae*. Muitos genes de ESBL são localizados em plasmídeos grandes com poucos números de cópias (Livermore, 1995).

O aumento da mortalidade por infecções causadas por *Klebsiella* spp. decorre principalmente de sepse, de choque séptico, das infecções da corrente sanguínea e da terapia antimicrobiana inadequada. Em pacientes em tratamento em UTIs com quadro de pneumonia hospitalar a taxa de mortalidade pode variar de 20-50%, podendo ser ainda maior em pacientes submetidos a ventilação mecânica. O aumento da mortalidade e a diminuição das opções de tratamento também estão associados à infecção por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Como a maioria dos bastonetes gram-negativos hospitalares, *Klebsiella* spp. pode ser resistente a múltiplos antimicrobianos e representam uma fonte importante de disseminação bacteriana no ambiente hospitalar (Jones, 2000; Paterson et al, 2003).

### **1.3 Mecanismos de resistência de *K. pneumoniae* aos antimicrobianos**

A resistência bacteriana aos  $\beta$ -lactâmicos está relacionada à síntese da parede celular ou à degradação da droga. Os mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos envolvem a redução da afinidade pelos alvos da droga (Penicillin Biding Proteins - PBP); a alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana e a inativação ou destruição da droga pela

hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico (Shlaes et al, 1997; Rice, 2001; Sousa Jr et al, 2004).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes normalmente necessitam de um tempo maior de hospitalização e de agentes terapêuticos mais potentes, que geralmente são mais tóxicos e mais caros, além de apresentarem uma maior taxa de morbidade e mortalidade que infecções causadas por germes sensíveis (Jacoby & Archer, 1991). As bactérias naturalmente resistentes podem ser selecionadas durante o uso de determinados antimicrobianos, levando à falência clínica. Adiciona-se ainda o fato de genes que codificam a resistência antimicrobiana poderem ser adquiridos de outras espécies bacterianas (Livermore, 1991).

O uso de agentes antimicrobianos exerce pressão seletiva e seleciona linhagens bacterianas com expressão de um gene de resistência para aquele agente e também de plasmídeos. Os genes de resistência e os plasmídeos podem ser disseminados, interconectando populações bacterianas comensais, ambientais e patogênicas. Os germes competem entre si em um dado nicho, mas competem também com pessoas, animais e ambiente. Assim, a mutação em uma dentre as milhões de enzimas, pode permitir melhor uso ou tolerância a algo em um complexo ambiente daquele nicho. O gene que codifica uma proteína específica que inativa o antimicrobiano pode sofrer mutações e serem importadas por plasmídeos. Esta nova linhagem mais resistente poderá se disseminar não só naquele nicho, mas também para outros. Uma linhagem resistente prevalece por seleção e transfere esta resistência, formando uma rede de hospedeiros que estão em tratamento com antibióticos (O'Brien, 2002).

### **1.3.1 Redução da afinidade pelos alvos da droga (PBPs)**

As  $\beta$ -lactamases nas bactérias gram-negativas estão localizadas no espaço periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agir mais eficazmente sobre os  $\beta$ -lactâmicos que estão atravessando este espaço para atingir seu alvo. O alvo destes antibióticos são as proteínas ligadoras de penicilina, as PBPs. A redução da afinidade pelas PBPs, situadas na membrana citoplasmática bacteriana ocorre por substituição de um aminoácido e esta alteração das PBPs impede a ligação da droga (Rice, 2001).

A modificação das PBPs é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos  $\beta$ -lactâmicos nos cocos gram-positivos e em algumas bactérias fastidiosas gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae* (Sanders & Sanders, 1992).

Durante a síntese da parede celular as bactérias mantêm a pressão osmótica interna, pois apresentam estrutura da parede celular rígida. A união de precursores da parede celular ocorre por catálise de enzimas específicas e de proteínas reguladoras, as PBPs. Quando a bactéria está exposta ao antibiótico através das porinas e esta se liga às PBPs, enzimas autolíticas são liberadas na membrana da célula, degradam a parede celular e levam a lise celular (Rossi & Andreazzi, 2005).

As PBPs também reagem com os  $\beta$ -lactâmicos para formar ésteres de serina, diferentes daqueles formados pelas  $\beta$ -lactamases. As PBPs possuem atividade hidrolítica fraca quando atuam nos  $\beta$ -lactâmicos e podem proteger a célula bacteriana se a entrada da droga for restringida pela impermeabilidade da membrana (Livermore, 1995).

### **1.3.2 Alteração da permeabilidade da membrana externa**

A alteração de permeabilidade da membrana externa bacteriana pode constituir um mecanismo de resistência nas gram-negativas, mas não nas gram-positivas, pois estas não possuem membrana externa. A perda de uma proteína de membrana ou porina da membrana externa (OMP) pode reduzir o acesso do antibiótico ao espaço periplasmático uma vez que os  $\beta$ -lactâmicos têm que cruzar a membrana externa das bactérias gram-negativas através de OMPs. Em bactérias mutantes estas porinas podem não ser produzidas e ocorre a impermeabilidade da membrana (Gales, 1997; Bradford, 2001; Rice, 2001). As OMPs de microrganismos gram-negativos são capazes de formar canais constituídos de água no seu interior que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana. As porinas chamadas de clássicas ocorrem na membrana externa como trímeros de 36 a 38kDa (Nikaido, 1994).

As OMPs são geralmente divididas em duas classes: porinas não específicas que permitem a difusão de moléculas hidrofílicas de baixo peso

molecular e porinas específicas, as quais facilitam a difusão de substratos específicos (Huang & Hancock, 1996). A taxa de entrada de um  $\beta$ -lactâmico pelos canais de porina depende do seu tamanho, carga e hidrofobicidade. Moléculas de alto peso molecular (moléculas maiores de 800Da são excluídas), negativamente carregadas e lipofílicas apresentam dificuldade na entrada da célula bacteriana. Por outro lado, moléculas pequenas, ziteriônicas e com características hidrofílicas apresentam rápida penetração. Moléculas pequenas e ziteriônicas como ampicilina, cefaloridina e imipenem penetram mais facilmente a membrana externa bacteriana (Nikaido, 1994).

Dentre as diferentes OMPs que se encontram na membrana externa estão OprC, OprD e OprE e a maior e mais abundante delas, a OprF, formada por polipeptídeo de 36-kDa. Provavelmente é a mais utilizada pela maioria dos  $\beta$ -lactâmicos para penetrar a bactéria. As OMPs, OprC e OprE são canais inespecíficos, no entanto, são utilizadas por alguns antimicrobianos (Vila & Marco, 2002).

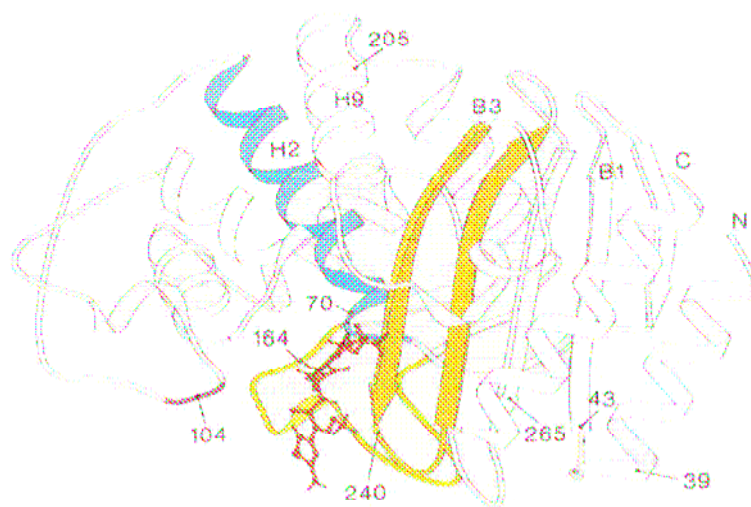
### **1.3.3 Degradação da droga**

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e são produzidas por uma grande variedade de diferentes espécies com características distintas. Nas bactérias gram-positivas estas enzimas são secretadas para o meio extracelular, e por estar em menor concentração neste meio possuem menor atividade. Nas bactérias gram-negativas estas enzimas são armazenadas no espaço periplasmático, fato que favorece sua maior concentração e o alcance mais fácil de seu alvo (Rossi & Andreazzi, 2005).

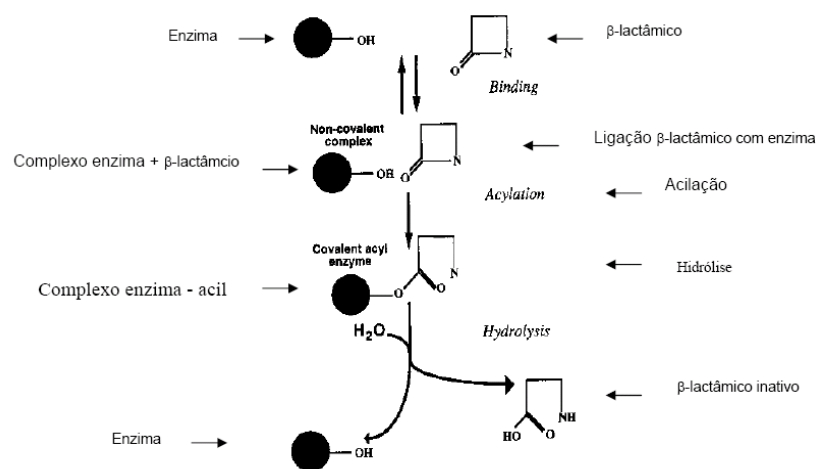
#### **1.3.3.1 $\beta$ -lactamases**

As  $\beta$ -lactamases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico impossibilitando assim sua atividade antimicrobiana. Este é o principal mecanismo de resistência das bactérias gram-negativas aos  $\beta$ -lactâmicos o qual inativa os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos diminuindo a habilidade destes de alcançarem o sítio ativo, as proteínas ligadoras de

penicilina (PBPs). As  $\beta$ -lactamases atuam via éster de serina em que o anel  $\beta$ -lactâmico é atacado pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina que ativa o sítio da enzima, produzindo um éster acil covalente. O anel  $\beta$ -lactâmico é rompido em sua cadeia lateral pelo radical hidroxil livre do resíduo de serina da  $\beta$ -lactamase (sítio ativo da enzima). Após a hidrólise do éster ocorre a liberação da enzima ativa e da droga inativada (Bush, 1983; Waley, 1987; Livermore, 1995; Rossi & Andreazzi, 2005; Babic et al, 2006). (Figura 2 e 3)



**FIGURA 2.** Estrutura terciária da  $\beta$ -lactamase TEM, classe A (Knox, 1995).



**FIGURA 3.** Ação da serina de uma  $\beta$ -lactamase (Waley, 1987).

A atividade de hidrólise do  $\beta$ -lactâmico varia de acordo com o tipo de substrato bem como com a suscetibilidade aos inibidores de  $\beta$ -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos dependerá da quantidade de enzima produzida, da habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o  $\beta$ -lactâmico penetra pela membrana externa (Bradford, 2001; Sousa Jr et al, 2004).

A importância clínica das  $\beta$ -lactamases está relacionada à sua produção que pode ocorrer em grandes concentrações. A síntese de ESBL pode ser induzida em algumas espécies bacterianas durante a terapêutica antimicrobiana, tendo em vista que virtualmente todas as bactérias gram-negativas produzem estas enzimas (Sader et al, 1999). A produção de  $\beta$ -lactamases é o resultado de um processo evolutivo e da pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos. Embora o uso destas drogas tenha auxiliado a disseminação deste mecanismo de resistência não foi o fator que provocou o aparecimento destas enzimas (Barbosa et al, 1998).

#### **1.3.3.1.1 Classificação das $\beta$ -lactamases**

Frente a grande diversidade de enzimas produzidas vários esquemas foram propostos para classificá-las (Richmond & Sykes, 1973, Sykes & Matthew, 1976). Entretanto, as classificações mais utilizadas são a de Ambler que classifica a enzima conforme a estrutura molecular e a de Bush, Jacoby e Medeiros que classifica a enzima de acordo com a afinidade pelo substrato e por sua suscetibilidade aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, dividindo em três grupos as  $\beta$ -lactamases que apresentam relevância clínica: as  $\beta$ -lactamases tipo Amp C, as ESBL e as  $\beta$ -lactamases que hidrolisam os carbapenêmicos (Ambler, 1980, Bush et al, 1995, Livermore, 1995) (Tabela 1).

**TABELA 1.** Características funcionais e moleculares dos principais grupos de  $\beta$ -lactamases

Grupo Funcional Bush et al, 1995	Subgrupos Bush et al, 1995	Classe Molecular Ambler, 1980	Características funcionais
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais de gram-negativos. Conferem resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenêmicos (a não ser que combinado com alteração de permeabilidade de membrana). Não são inibidas por ácido clavulânico.
2		A, D	Grande maioria das enzimas é inibida por ácido clavulânico.
	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência às penicilinas.
	2b	A	$\beta$ -lactamases de espectro reduzido de bactérias gram-negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1.
	2be	A	$\beta$ -lactamases de espectro ampliado conferem resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
	2br	A	$\beta$ -lactamases derivadas da TEM resistentes ao inibidor de $\beta$ -lactamases (IRT).
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenecilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); pouco inibidas pelo ácido clavulânico.
	2e	A	Cefalosporinases inibidas pelo ácido clavulânico.
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenems com sítio ativo serina, inibidas por ácido clavulânico.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- $\beta$ -lactamases que conferem resistência aos carbapenems e todos os outros $\beta$ -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico.
4		ND	Enzimas não seqüenciadas que não se encaixam em outros grupos.

Abreviatura: ND - não determinada (Adaptado do artigo de Bush, 2001).

### 1.3.3.1.2 $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL)

A função catalítica das ESBLs é capaz de produzir altos graus de resistência bacteriana aos antimicrobianos. A disseminação dessas enzimas e o surgimento de novas variantes destas ocorreram nos últimos anos devido a grande utilização de antibióticos (Nicolas-Chanoine, 1996; Sader et al, 1999; Rossi & Andreazzi, 2005).



As ESBLs estão no grupo funcional 2be de Bush e no grupo A de Ambler. As ESBLs são enzimas mediadas por genes plasmidiais, não induzíveis e possuem resíduo de serina em seu sítio ativo. São enzimas capazes de hidrolisar oximinocefalosporinas e monobactâmicos e são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Dos três inibidores disponíveis para o uso clínico o ácido clavulânico é o mais potente (Tabela 1) (Jacoby e Medeiros, 1991; Bush, Jacoby e Medeiros, 1995; Bush et al, 1995; Livermore, 1995; Tenover et al, 1999; Jones, 2000; Bradford, 2001; Giamarellou, 2005).

A emergência desse tipo de  $\beta$ -lactamase provavelmente decorre da pressão seletiva causada pelo amplo uso de cefalosporinas de amplo espectro (Meyer et al, 1993). Os primeiros relatos de ESBL ocorreram em 1983 em Frankfurt, posteriormente na Europa e logo após nos EUA e Ásia, sendo estas enzimas resultantes de mutações que ocorrem em genes plasmidiais, derivadas de ESBLs mais antigas (Bush, 1998; Bradford, 2001).

A produção de ESBL ocorre predominantemente em *Klebsiella* spp. e em menor grau em *E. coli*, mas pode ser encontrada em vários patógenos clinicamente importantes. Desta forma, virtualmente todas as espécies de *Klebsiella* carregam um gene similar ao SHV-1 cromossomal e algumas cepas podem produzir múltiplas ESBLs (Jacoby et al, 1991; Philippon et al, 1989; Tenover et al, 1999; Bradford, 2001; Rice, 2001; Thomson, 2001).

A evolução das ESBLs, com múltiplas mudanças de aminoácidos, reflete o acúmulo de mutações aleatórias que gradativamente aumentam a atividade destas cefalosporinases até a expressão de resistências clinicamente significativas. Mesmo com o desenvolvimento de novos  $\beta$ -lactâmicos há a emergência de novas  $\beta$ -lactamases de todas as linhagens causando resistência às novas drogas (Nicolas-Chanoine, 1996; Bradford, 2001; Rice, 2001; Paterson & Bonomo, 2005). Atualmente existe uma grande variedade de ESBLs distinguidas pelo perfil do substrato, reação com inibidores e ponto isoelétrico. Em outubro de 2006, havia 155 tipos de TEM, 98 de OXA, 92 de SHV, 3 de PER, CTX-M-1 a 58, UOL-1, Toho 1 e 2 (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>. Consulta em outubro de 2006).

Apesar de amostras produtoras de ESBL serem classificadas como sensíveis a vários desses  $\beta$ -lactâmicos, vários relatos de falhas terapêuticas

têm sido descritos. Isso porque a resistência a esse agente pode não ser identificada durante o antibiograma, visto que a produção da enzima ocorre em pequenas quantidades e varia conforme o tempo de incubação. Além disso, o grau de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é variável e depende da quantidade de enzima produzida, do inóculo, de sua habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o antibiótico penetra na membrana externa da bactéria (Sader, 2000).

Embora amostras bacterianas produtoras de ESBL tenham sido descritas em todos os continentes, com exceção da Antártida, acredita-se que os dados de prevalência sejam subestimados. Isso porque os testes de sensibilidade aos antimicrobianos rotineiramente usados têm dificuldades em detectar a produção de ESBL por essas amostras. Portanto, o impacto das  $\beta$ -lactamases associadas ao uso clínico de  $\beta$ -lactâmicos depende do espectro de atividade das enzimas, da prevalência da produção da enzima numa determinada espécie, da frequência do envolvimento do patógeno nas infecções e da infecção ser tratada em um hospital ou na comunidade (Gales, 1997).

Ainda que a detecção destas amostras seja difícil, vários estudos têm demonstrado a importância dessas infecções por todo o mundo. As falhas na detecção de amostras produtoras de ESBL dificultam a identificação de surtos e a tomada de medidas de controle para prevenir a disseminação destas amostras (Thomson et al, 1996).

#### **1.3.3.1.2.1 SHV**

A enzima SHV é uma ESBL produzida por *Enterobacteriaceae*, notadamente em *Klebsiella* spp.. A SHV foi assim denominada em função da sua estrutura química (sulphhydryl variable). São codificadas por plasmídeos, portanto, facilmente transferidas para outras bactérias. Entretanto, também podem ocorrer  $\beta$ -lactamases codificadas no cromossomo (Rossi & Andreazzi, 2005).

A SHV-1 é a enzima mais comumente encontrada em *K. pneumoniae* e responsável por mais de 20% da resistência a ampicilina mediada por plasmídeos. Em algumas cepas de *K. pneumoniae* o gene *bla*SHV-1 é

integrado ao cromossomo bacteriano. As  $\beta$ -lactamases mediadas por plasmídeos ou transposons podem ser transferidas horizontalmente entre bactérias de mesma espécie ou entre espécies não correlacionadas. A maior parte das SHV é produzida constitutivamente, isto é, a produção enzimática independe de um agente indutor (Livermore, 1995; Sader et al, 1999; Bradford, 2001; Rice, 2001; Rossi & Andreazzi, 2005).

A SHV tem ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,2 e não hidrolisa as cefamicinas e carbapenems, mas é capaz de hidrolisar as oximinocefalosporinas e é inibida pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases. Há relativamente poucos derivados de SHV-1 e a maioria dos fenótipos ESBL são caracterizados pela substituição de serina por glicina na posição 238. A família SHV é mais frequentemente encontrada em *K. pneumoniae*, contudo, esta enzima também já foi relatada em *Citrobacter diversus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Bradford, 2001).

A SHV-2 é a primeira  $\beta$ -lactamase capaz de hidrolisar os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro. Foi identificada pela primeira vez em uma linhagem de *K. ozoenae* isolada na Alemanha (Bradford, 2001). Logo após sua descoberta também houve sua identificação em outros países como a Argentina, Chile, China, Grécia, França e Tunísia (Philippon, 1989).

A SHV-6 tem capacidade de hidrolisar ceftazidima e monobactâmicos, porém não tem atividade contra cefalosporinas de espectro estendido como a cefotaxima. Foi inicialmente identificada em *K. pneumoniae* em 1991 na França (Bradford, 2001).

A SHV-38 é o primeiro relato de SHV  $\beta$ -lactamase capaz de hidrolisar imipenem. Esta é também a primeira SHV codificada cromossomalmente em *K. pneumoniae* e a emergência da SHV-38 pode constituir o primeiro passo

para a seleção de enterobactérias com alta resistência aos carbapenems (Poirel et al, 2003).

Em um estudo realizado na Europa, Babini & Livermore (2000) identificaram a presença do gene *bla* SHV em 84% das amostras de *K. pneumoniae* estudadas, demonstrando a importância clínica da detecção deste tipo de resistência bacteriana.

#### 1.3.3.1.2.2 TEM

As variantes de ESBL de maior interesse clínico provêm da família da TEM, enzima assim nomeada em homenagem ao primeiro isolado produtor coletado de uma menina grega de nome Temoniera. Estas enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas. A TEM e SHV têm discreta diferença estrutural e esta diferença está relacionada a mudanças de aminoácidos junto ao sítio ativo da enzima. Estas mudanças podem alterar sua configuração, o ponto isoelétrico ou as propriedades de ligação do sítio ativo, aumentar a afinidade da enzima e habilidade hidrolítica pelo substrato oximino. A  $\beta$ -lactamase plasmidial mais comum é a TEM-1 encontrada em enterobactérias com capacidade de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração como a cefalotina e cefaloridina (Philippon et al, 1989).

A TEM-2 é a primeira ESBL derivada da TEM-1 por uma substituição de um aminoácido, mas não muda sua atividade sobre o substrato. A primeira a mudar o perfil do substrato foi a TEM-3. Tanto a TEM-1 como a TEM-2 tem ponto isoelétrico (PI) entre 5,5 e 6,3; mas isoladamente o PI não permite a diferenciação de todas as variantes de TEM. Assim o perfil dos inibidores é fundamental nesta diferenciação (Philippon, 1994; Bradford, 2001).

O fato da TEM-1 ser mediada por plasmídeo e transposons facilita sua disseminação para outras espécies de bactérias. O primeiro grande surto devido a bactérias produtoras de ESBL, especificamente por produtores de TEM-3 ocorreu em Clermont-Ferrand entre 1985-1987. Outros surtos ocorreram em Chicago, Nova Iorque, São Francisco e Boston em 1990 (Livermore, 1995).

As enzimas do tipo TEM são mais comuns em *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas também já foram identificadas em *E. aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* e *Salmonella* spp. (Bradford, 2001). Dentre as enzimas desta família a TEM-12 tem menor poder hidrolítico, pois apresenta grande suscetibilidade a oximino-aminotiazolil cefalosporinas (Essack et al, 2001).

#### 1.3.3.1.2.3 CTX-M

A CTX-M é também uma enzima plasmidial pertencente à classe A de Ambler e que confere resistência a todas as cefalosporinas de espectro ampliado. Esta enzima tem maior atividade hidrolítica pela cefotaxima que a ceftazidima e é inibida pelos inibidores de  $\beta$ -lactamase, sendo mais sensíveis ao tazobactam que ao ácido clavulânico (Livermore, 1995; Babic et al, 2006). Contudo, algumas vezes as CTX-M hidrolisam ceftazidima, mas não causam resistência clínica aos microrganismos produtores desta enzima, sendo geralmente sensíveis a esta droga. As enzimas CTX-M poderão surgir por aquisições de plasmídeos de genes ESBL cromossomais pré-existentes de *Kluyvera* spp.. Estas enzimas têm somente 40% de semelhança com a TEM e SHV, mas formam um grupo de ESBL com ampla emergência (Babic et al, 2006).

A CTX-M-1 é formalmente denominada de MEN-1, tendo somente 84% de homologia com as outras enzimas CTX. A maioria dos genes é localizada em plasmídeos (Poirel, 2001). As cepas que expressam CTX-M já foram isoladas em diferentes locais no mundo, mas são mais freqüentemente na Europa, América do Sul e Japão (Sirot et al, 1988). Estas enzimas são encontradas em *Salmonella enterica* e *E. coli*, mas também foram reportadas em *Enterobacteriaceae*. A primeira CTX-M foi detectada em *E. coli* na Alemanha e Itália em 1989. Em *K. pneumoniae* a CTX-1 foi observada pela primeira vez em 1984 na França devido à pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de cefotaxima. Contudo ainda não há

relatos de CTX-M na Europa Ocidental nem na América do Norte (Bonnet et al, 2002).

A CTX-M-2, por sua vez, é a enzima mais freqüentemente documentada em *K. pneumoniae* com cerca de 80% dos casos. Na Argentina, Uruguai e Paraguai esta é a enzima mais freqüente sendo a PER-2 a segunda enzima mais prevalente em enterobactérias na América do Sul (Casellas, 2000; Bonnet et al, 2002). No Brasil, estudo realizado por Carmo Filho (2003) no Hospital São Paulo isolou duas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M e que posteriormente foi identificada como uma CTX-M-2 (Dado não publicado). Outro estudo brasileiro identificou a CTX-M-8 e a CTX-M-16 no Rio de Janeiro, tendo mais de 80% de semelhança com as outras CTX-M (Bonnet et al, 2001; Paterson & Bonomo, 2005). A maior preocupação atualmente é a detecção da CTX-M em isolados também de infecções comunitárias (Babic et al, 2006).

#### **1.3.3.1.3 Metallo-Betalactamases (MBL)**

As metalo-betalactamases são enzimas de amplo espectro que hidrolisam não somente penicilinas e cefalosporinas, como também outros  $\beta$ -lactâmicos como imipenem e meropenem, mas não hidrolisam o aztreonam. A metalo-enzima se mostra como a grande preocupação mundial pela sua emergência e sua ação catalítica sobre o grupo dos carbapenêmicos (Rossi & Andreazzi, 2005).

A classe B das metalo-betalactamases foi descoberta há mais de quarenta anos por Abraham em uma linhagem de *Bacillus cereus*. A IMP-1 foi reportada pela primeira vez em 1991 em *Pseudomonas aeruginosa*. Os genes codificadores destas enzimas são geralmente cromossomais, mas alguns podem ser plasmidiais, o que permite que se disseminem mais rapidamente entre os microrganismos. As metalo-betalactamases foram reportadas em poucos isolados de *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Page, 2002; Rossi & Andreazzi, 2005). De acordo com sua classificação bioquímica, as metalo-enzimas fazem parte do grupo 3 de Bush, Jaboby e Medeiros e são divididas em subgrupos 3a, 3b, 3c, separados por sua capacidade catalítica. As enzimas 3a hidrolisam, mais rapidamente, penicilinas

a carbapenêmicos. As 3b agem especificamente sobre carbapenens. Por fim, as 3c possuem alta atividade como cefalosporinases (Bush, 1998).

As metalo-enzimas, se caracterizadas geneticamente, são classificadas como classe B de Ambler e denominadas de IMP-1 e VIM-1. Estas enzimas foram identificadas pela primeira vez em *Pseudomonas aeruginosa* e possuem alta capacidade de hidrólise dos substratos como as penicilinas, cefalosporinas, oxacefamicinas e carbapenêmicos. Sua atividade é zinco dependente e são inibidas pelo EDTA (Poirel et al, 2001).

Estas enzimas requerem pelo menos um íon zinco por molécula para ser cataliticamente ativas. O mecanismo de ação das metalo-betalactamases pode não ser único e pode variar conforme os diferentes substratos e a fonte da enzima. Já foram identificadas em todo o mundo e podem ser produzidas por ação plasmidial ou cromossomal. Sua estrutura é formada por moléculas responsáveis pelo enorme potencial de expressão e disseminação das resistências bacterianas. Estes genes cassetes são capturados por integrons de classe 1, 2 e 3, os quais ligam a enzimas (Poirel et al, 2000; Shibata et al, 2003).

Os determinantes genéticos são associados à integrons de classe 1, mas alguns se associam à integrons de classe 3 ou podem se integrar a um plasmídeo, como descrito em *K. pneumoniae* com resistência aos carbapenêmicos. A cepa apresentou resistência ao imipenem, meropenem, amoxicilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, aztreonam e ceftriaxona (Page, 2002; Babic, 2006).

Na América Latina foi encontrado o primeiro caso de *K. pneumoniae* multiresistente contendo o gene *blaIMP-1* com integron classe 1. O material foi coletado do sangue de um paciente de 75 anos com pneumonia hospitalar, com choque séptico e falha na terapia com imipenem (Lincopan et al, 2005). O tipo plasmidial de metalo-betalactamase envolve pelo menos três grupos principais: IMP, VIM e SPM (Shibata et al, 2003). Já se conhecem as seguintes variáveis de metalo-betalactamases: IMP-1 a IMP-8, VIM-1 a VIM-12, PCM, CcrA, CphA, ACPs e L1 (Page, 2002).

### 1.3.3.2 Amp C betalactamase

As Amp C  $\beta$ -lactamases são enzimas mediadas por plasmídeos, capazes de hidrolisar  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro e com atividade contra cefamicinas. Estas enzimas são derivadas de genes cromossomais de bactérias gram-negativas e são resistentes a penicilinas de espectro estendido, monobactâmicos e cefamicinas. São, contudo, sensíveis a cefepime, cefpirome e carbapenêmicos. Estas enzimas pertencem ao grupo 1 de Bush ou classe C de Ambler, não são inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamase como o ácido clavulânico e têm modo de expressão cromossômico-induzível. Contudo, a produção de Amp C, em alguns casos, independe do agente indutor. Para que seja mantida a produção da AmpC em níveis elevados, faz-se necessário a ocorrência de duas mutações separadas, uma aumentando a eficiência do gene promotor e outra inativando o gene repressor (Limaye et al, 1997; Sader, 2000; Pai, 2004; Rossi & Andreazzi, 2005).

Os primeiros relatos de bactérias produtoras de AmpC  $\beta$ -lactamases ocorreram em 1988, sendo encontradas exclusivamente em nível de expressão cromossômica e desde então várias enzimas AmpC mediadas por plasmídeos passaram a ser relatadas em *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. e *Proteus mirabilis*. Em alguns microrganismos gram-negativos como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* ocorre a produção de AmpC constitutivamente em quantidades insuficientes para causar resistência a antimicrobianos de amplo espectro. Em outros como *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Serratia marcescens* a AmpC é produzida de forma induzida, determinando resistência a cefalosporinas de terceira geração. O poder de indução é variável: as cefalosporinas de primeira geração, ampicilina e carbapenems são fortes indutores enquanto que as cefalosporinas de segunda e terceira gerações são indutores fracos. A indução da produção de AmpC ocorre pela exposição do microrganismo a um antibiótico indutor, que uma vez removido fará com que a produção de AmpC retorne aos níveis basais (Rossi & Andreazzi, 2005).

A resistência às cefamicinas pode ocorrer durante o tratamento especialmente em infecções com alto inóculo bacteriano. Isso porque durante o tratamento o gene regulador da produção de tal enzima deixa de exercer



sua atividade e o gene produtor expressa livremente com a síntese de grande quantidade de AmpC. Por outro lado, uma simples mutação ocorrida no gene repressor pode fazer com que o mesmo perca sua função regulatória e a bactéria passará a expressar AmpC constitutiva resultando na falência terapêutica que poderá ocorrer mesmo que a bactéria produza somente ESBL (Thomson, 2001). Nestes casos, recomenda-se a associação de um aminoglicosídeo ao  $\beta$ -lactâmico ou a utilização de um  $\beta$ -lactâmico mais estável a essas enzimas, tais como as cefalosporinas de quarta geração ou carbapenems. Embora a resistência também possa ocorrer para estes últimos, eles são estáveis a hidrólise e a produção de grandes quantidades de AmpC não é suficiente para levar a resistência, sendo necessária a associação com a diminuição da permeabilidade da membrana externa (Nicolas - Chanoine, 1996; Limaye et al, 1997).

As amostras com altos níveis de expressão de AmpC são também de difícil identificação, pois podem impedir o reconhecimento de uma ESBL, especialmente em espécies ou linhagens de *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Aeromonas* spp., *M. morgani*, *C. freundii*, *Hafnia alvei* e *P. aeruginosa*, que codificam cromossomalmente AmpC induzível. Nestes organismos, o clavulanato poderá atuar como indutor de grande produção de AmpC e aumentar a resistência de um isolado a outras drogas usadas na triagem e produzirem resultado falso-positivo na detecção de uma ESBL. Para estes organismos os inibidores preferíveis são o tazobactam e o sulbactam por serem menos prováveis de induzir a produção de AmpC (Thomson, 2001).

## 2 OBJETIVOS

1 – Avaliar a prevalência de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado em três hospitais de Goiânia;

2 – Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras e não produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado;

3 – Avaliar a variação genética das amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado isoladas no hospital com maior prevalência de infecções causadas por este microrganismo.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Investigação microbiológica

#### 3.1.1 Amostras bacterianas

Foram selecionadas para o estudo 77 amostras clínicas consecutivas, sendo uma amostra por paciente, identificadas como *Klebsiella* spp. isoladas de pacientes internados em três hospitais de Goiânia: Hospital A - Hospital Araújo Jorge (hospital especializado em oncologia), Hospital B - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás e Hospital C - Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, no período de janeiro de 2005 a maio de 2006. Após serem reidentificadas, 68(88,3%) amostras foram confirmadas como *Klebsiella*, sendo 61(89,7%) *K. pneumoniae* e 7 (10,3%) *K. oxytoca*. Estas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Clínica do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde (LAMIC), estocadas em meio TSB contendo 5% de glicerol e mantidas a -70 °C. Para confirmação da viabilidade e identificação do gênero *Klebsiella*, as amostras foram retiradas do banco de microrganismos, semeadas em meio seletivo, ágar MacConkey, incubadas em aerobiose a 35°C por 18 horas.

#### 3.1.2 Identificação bacteriana

A identificação das bactérias foi realizada rotineiramente no Setor de Microbiologia dos Laboratórios dos Hospitais A, B e C e confirmada no Laboratório da Área da Saúde - UCG por meio de método automatizado semiquantitativo MicroScan WalkAway® (Dade Behring, USA) utilizando-se painéis Neg-Combo 32(NC-32), conforme as recomendações do fabricante.

#### 3.1.3 Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

As amostras foram retiradas do banco de microrganismos do LAMIC - UCG e semeadas em ágar MacConkey (Oxoid®, Inglaterra) por duas vezes. Após o isolamento das colônias puras, os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados através do método automatizado semiquantitativo MicroScan WalkAway® (Dade Behring, USA), conforme as

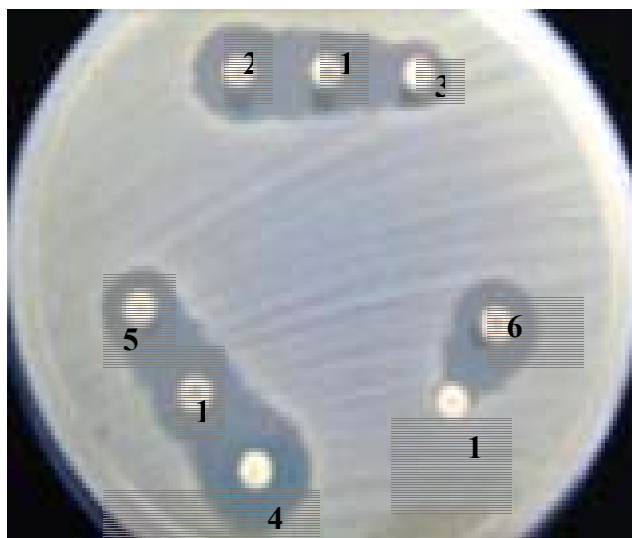
recomendações do fabricante. As amostras foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes, utilizando-se os limites de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI (2005).

#### **3.1.4 Identificação fenotípica das cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL**

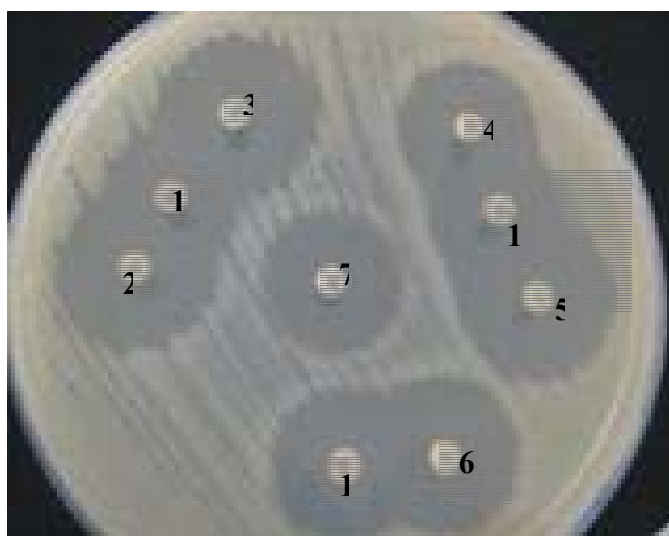
O método de triagem para detecção de cepas produtoras de ESBL baseou-se no perfil de sensibilidade e as prováveis amostras produtoras de ESBL foram identificadas segundo critérios estabelecidos pelo CLSI (2005), no qual houve resistência a qualquer um dos cinco substratos (aztreonam, ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima) e o teste confirmatório realizado através do teste de disco-difusão dupla ou disco de aproximação.

Para cada amostra de *K. pneumoniae*, uma suspensão bacteriana foi feita utilizando-se solução salina a 0,9% e a turbidez foi ajustada a metade da escala 1 de McFarland. Após a homogeneização da suspensão, essa foi semeada em placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton (Oxoid®, Inglaterra), usando-se um swab. O swab foi umedecido com a solução bacteriana e o excesso retirado comprimindo-se o mesmo contra as paredes do tubo contendo a solução. A inoculação no ágar foi feita em toda a extensão da placa e repetida por três vezes girando-se a placa. Após aproximadamente 15 minutos da semeadura, os discos de difusão foram colocados sobre o ágar com o auxílio de uma pinça. Para o método de disco aproximação foram utilizados os seguintes discos: amoxicilina/ácido clavulânico (20µg /10µg) (Sensifar, Brasil), aztreonam (30µg), ceftriaxona (30µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg) e cefpodoxima (30µg) (Oxoid®, Inglaterra). Para esta metodologia o disco de amoxicilina/ácido clavulânico (20µg /10µg) foi colocado a 20mm centro a centro de cada oximino-betalactâmico testado, conforme a orientação do CLSI (2005). O disco de cefoxitina (30µg) foi utilizado para teste complementar para triagem quanto a possível produção de AmpC. O diâmetro dos halos de inibição foi lido após a incubação à temperatura de 35 °C, por 18 a 24 horas (halos de inibição > 22 mm para cefpodoxima, ou >27mm para aztreonam, ou > 27mm cefotaxima, ou > 25mm para ceftriaxona ou > 22mm para ceftazidima). O teste

foi considerado positivo quando houve ampliação do halo de inibição em algum oximino-beta-lactâmico ou a formação de uma terceira zona irregular de inibição, a zona fantasma, entre o disco composto e o disco de  $\beta$ -lactâmico (Figura 4) (Vercauteren et al, 1997; Sousa Jr et al, 2004). Para a triagem da produção de AmpC um aumento > 5mm no halo de inibição foi considerado como teste positivo quanto a produção desta enzima. O controle de qualidade foi realizado utilizando-se as amostras da American Type Culture Collection (ATCC) de *Escherichia coli* ATCC 25922; *K. pneumoniae* ESBL ATCC 700603.



**FIGURA 4.** Teste positivo para produção de ESBL pela metodologia de disco de aproximação em ágar Müller-Hinton (Oxoid®, Inglaterra), (1) Disco associado de amoxicilina/ácido clavulânico, (2) Disco de ceftazidima, (3) Disco de cefotaxima, (4) Disco de ceftriaxona, (5) Disco de cefpodoxima, (6) Disco de aztreonam.



**FIGURA 5.** Teste negativo para produção de ESBL pela metodologia de disco de aproximação em ágar Müller-Hinton (Oxoid®, Inglaterra). (1) Disco de amoxicilina/ácido clavulânico, (2) Disco de ceftazidima, (3) Disco de cefotaxima, (4) Disco de ceftriaxona, (5) Disco de cefpodoxima, (6) Disco de aztreonam, (7) Disco de cefoxitina.

### 3.2 Eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE)

O perfil genético dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes do Hospital C foi determinado por eletroforese do DNA em gel em campo pulsado (PFGE) o qual foi digerido pela endonuclease de restrição Xba1, utilizando o aparelho CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Foi semeada uma colônia em 3,0 mL de caldo TSB e incubado a 37°C por 18 horas. Após a incubação, 500 µL do cultivo foi centrifugado a 6.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 300 µL de tampão TEN (5,0 mL EDTA 0,5M pH 7,0; 5,0 mL EDTA 0,5M pH 8,0; 2,5 mL Tris base 1M pH 7,0; 2,5 mL Tris base 1M pH 8,0; 1,875 mL NaCl 4M; H<sub>2</sub>O destilada qsp 50 mL) e acrescido de 340 µL de agarose SeaKem Gold a 1,2%. Esta mistura foi colocada em três moldes, aguardando a solidificação a 5 °C por quinze minutos. Após a solidificação os *plugs* foram transferidos para *eppendorf* com 1300 µL de tampão EC (5,0 mL EDTA 0,5M pH 7,0; 5,0 mL EDTA 0,5M pH 8,0; 1,5 mL Tris base 1M pH 7,0; 1,5 mL Tris base 1M pH 8,0; 29,22 g NaCl; 2,5 g N-lauril sarcosil; 2,5 g Brij 58; 1,0 g Desoxicolato de sódio; H<sub>2</sub>O destilada qsp 500 mL) adicionado de 200 µL de solução de lisozima (10 mg/ml) e incubados a 37°C por 5 horas. Após a incubação, os *plugs* foram enxaguados com 1500 µL de tampão CHEF TE 1X (5,0 mL EDTA 0,5M pH 7,0; 5,0 mL EDTA 0,5M pH 8,0; 2,5 mL Tris base 1M pH 7,0; 2,5 mL Tris base 1M pH 8,0; H<sub>2</sub>O destilada qsp 50 mL) e lavados com este mesmo tampão por mais quatro vezes com intervalo de 30 minutos. Em seguida o CHEF TE 1X foi aspirado dos *eppendorfs* e os *plugs* foram cobertos com 1400 µL de tampão ES (40 mL EDTA 625 mM pH 9,3 e 10 mL N-lauril sarcosil 5%) e com 100 µL de solução de Proteinase K (20 mg/mL) e incubados a 50°C durante a noite. Na manhã seguinte o tampão ES foi aspirado e os *plugs* foram enxaguados com 1500 µL de tampão CHEF TE 1X e lavados com este mesmo tampão por mais quatro vezes. Após a última lavagem foi cortado aproximadamente um terço de cada *plug* foi separado para a digestão, enxaguado com 200 µL de tampão DNS (5,0 mL Trisma base 1M pH 8,0; 250 µL Cloreto de magnésio 1M) e incubado em temperatura ambiente por uma hora em 200 µL deste tampão. Completado o tempo de incubação os *plugs* foram lavados com 200 µL deste último tampão

por mais quatro vezes com intervalo de uma hora por lavagem. O DNS foi aspirado sendo colocado em cada *plug* 50  $\mu$ L do tampão da enzima Xba1 (810  $\mu$ L de água bidestilada esterilizada com 90  $\mu$ L de tampão 10X) e incubado a 5°C por uma hora para estabilização. Em seguida foi aspirado este tampão e colocado 50  $\mu$ L do tampão da enzima com 2  $\mu$ L da enzima Xba1 por *plug* e incubado a 5°C por duas horas e após esse tempo seguiu para a incubação em banho-maria a 37°C por 20 horas. O DNA digerido foi separado pelo PFGE por 19 horas usando agarose para PFGE a 1% em 2,0 ml de tampão TBE 0,5X (TBE 10X = 3,7 g EDTA; 121,1 g Tris base; 61,8 g ácido bórico; H<sub>2</sub>O destilada qsp 1000 ml) nas seguintes condições: 14°C, 6 V cm<sup>-1</sup>, pulso inicial 5,0, pulso final 60 no aparelho CHEF DR-II. O marcador molecular *lambda ladder* (Bio-Rad) foi incluído em cada gel. Após o tempo de corrida o gel foi corado com solução de brometo de etídio (250 mL de H<sub>2</sub>O destilada e 20  $\mu$ L de brometo de etídio – 10 mg/mL) por uma hora, visualizado em transiluminador e fotografado sob luz ultra violeta (UV).

Segundo os critérios de interpretação definidos por Pfaller et al (1992) os isolados de *K. pneumoniae* foram agrupados em cepas idênticas ou relacionadas. A comparação das bandas obtidas na eletroforese foi realizada utilizando-se a inspeção visual da fotografia e o *software* BioNumerics v. 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) foi usado para análise em computador com tolerância de 0.5% para otimização e de 1.5% para comparação de bandas. Um pulsotipo (PT) foi definido como um único perfil eletroforético, assim os isolados com perfis de restrição idênticos foram considerados dentro do mesmo tipo e identificados com uma letra maiúscula. Cepas apresentando o perfil de eletroforese com uma a três bandas diferentes foram consideradas fortemente relacionadas sendo classificadas como subtipos (ST) indicados no dendrograma com a letra maiúscula seguida de numeral arábico. Os isolados com mais de três bandas diferentes foram considerados tipos diferentes. A comparação entre isolados de diferentes géis foi possível pela inclusão, em cada gel, de um isolado no qual o perfil PFGE havia sido previamente determinado.

## 4 Resultados

### 4.1 Distribuição das amostras de *Klebsiella* spp. por centro participante do programa de vigilância de resistência bacteriana

Entre janeiro de 2005 e maio de 2006 foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Clínica 77 amostras clínicas, mas somente 68 amostras foram confirmadas como *Klebsiella* spp., as quais foram coletadas em três hospitais de Goiânia: Hospital A - Hospital Araújo Jorge (hospital especializado em oncologia), Hospital B - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás e Hospital C- Santa Casa de Misericórdia de Goiânia (hospital Geral). Dentre as 68 amostras estudadas 61 eram *Klebsiella pneumoniae* (89,7%) e 7 eram *Klebsiella oxytoca* (10,3%) sendo estas últimas todas provenientes do Hospital A, coletadas em diferentes unidades de internação em infecções de urina e sangue.

A distribuição das 68 amostras clínicas de *Klebsiella* spp. estão apresentadas na tabela 2 e demonstra que 58,8% das amostras foram isoladas no hospital A; 10,3% no hospital B e 30,9% no hospital C. Quanto a unidade de internação; 57,4% foram isoladas de pacientes da clínica médica; 27,9% da clínica cirúrgica e 14,7% da UTI.

**TABELA 2.** Distribuição das 68 amostras de *Klebsiella* spp. provenientes de três centros participantes em Goiânia entre janeiro de 2005 a maio de 2006

Centro participante	Unidade de Internação			Total por centro N (%)
	UTI	CM	CC	
Hospital A	6	23	11	40 (58,8)
Hospital B	2	4	1	7 (10,3)
Hospital C	2	12	7	21 (30,9)
<b>Total por unidade de internação N (%)</b>	10 (14,7)	39 (57,4)	19 (27,9)	68 (100)

Legenda: Hospital A – Hospital especializado em oncologia, Hospital B – Hospital Universitário, Hospital C – Hospital Geral, UTI - unidade de terapia intensiva, CM - clínica médica, CC - clínica cirúrgica.



## 4.2 Distribuição das amostras clínicas de *Klebsiella* spp. por sítio de isolamento

A maioria das amostras analisadas apresentadas na Tabela 3 foi enviada do Hospital A, 40 (58,8%), seguidas pelo Hospital C, 21(30,9%) e Hospital B, 7(10,3%) . Os principais sítios de isolamento de *Klebsiella* spp. foram sangue 29,4%, urina 55,9% e vias aéreas inferiores 8,8%. Em menores proporções outros sítios também foram envolvidos como medula óssea 1(1,5%), pleura 1(1,5%), peritônio 1(1,5%) e ferida 1(1,5%).

**TABELA 3.** Distribuição das amostras clínicas de *Klebsiella* spp. por sítio de isolamento coletadas nos Hospitais A, B e C em Goiânia no período entre janeiro de 2005 a maio de 2006

<i>Sítio de isolamento</i>	<i>Hospital A</i>	<i>Hospital B</i>	<i>Hospital C</i>	<i>Total por sítio de isolamento N (%)</i>
Urina	18	2	18	38(55,9)
Sangue	15	3	2	20 (29,4)
Vias aéreas inferiores	6	-	-	6 (8,8)
Medula óssea	-	1	-	1 (1,5)
Pleura	-	1	-	1 (1,5)
Peritônio	1	-	-	1 (1,5)
Ferida	-	-	1	1 (1,5)
<b>Total N (%)</b>	<b>40 (58,8)</b>	<b>7 (10,3)</b>	<b>21 (30,9)</b>	<b>68 (100)</b>

Legenda: Hospital A – Hospital especializado em oncologia, Hospital B – Hospital Universitário, Hospital C – Hospital Geral.

#### 4.3 Prevalência de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL

A prevalência de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em Goiânia foi de 38,2%. Distribuídas por centro participante a prevalência da produção de ESBL foi de 25%; 28,5% e 66,7% respectivamente para os hospitais A, B e C como demonstrado na Tabela 4. Nenhuma das amostras de *K. oxytoca* eram produtoras de ESBL.

**TABELA 4.** Prevalência de amostras clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, por centro participante, coletadas nos Hospitais A, B e C em Goiânia no período entre janeiro de 2005 a maio de 2006

Hospital	Amostra clínica produtora de ESBL N (%)
Hospital A	10 (25%)
Hospital B	2 (28,5%)
Hospital C	14 (66,7%)
Total	26 (38,2%)

Legenda: Hospital A – Hospital especializado em oncologia, Hospital B – Hospital Universitário, Hospital C – Hospital Geral, ESBL –  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado.

A confirmação da produção de ESBL foi realizada entre as 33 amostras clínicas previamente selecionadas pelo teste de triagem (halos de inibição > 22 mm para cefpodoxima, ou > 27mm para aztreonam, ou > 27mm cefotaxima, ou > 25mm para ceftriaxona ou > 22mm para ceftazidima), de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2005). Os substratos que apresentaram melhor atividade para a confirmação do fenótipo ESBL pela metodologia do disco de aproximação foram ceftaxima e cefpodoxima, que apresentaram maior sensibilidade com atividade em 100% das amostras. A ceftazidima teve atividade em 73,1% das amostras, a ceftriaxona em 96,2% e o aztreonam em 88,5% conforme demonstrado na Tabela 5.

**TABELA 5.** Resultado do teste confirmatório de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL de acordo com o teste de disco de aproximação

Número de amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com fenótipo ESBL (1)	Antimicrobianos				
	CAZ N (%)	CRO N (%)	CTX N (%)	CPD N (%)	ATM N (%)
26 (100%)	19(73,1)	25(96,2)	26(100)	26(100)	23(88,5)

Legenda: CAZ - ceftazidima; CRO - ceftriaxona; CTX - cefotaxima; CPD - cefpodoxima; ATM – aztreonam. (1) Segundo critérios do National Committee for Clinical Laboratory Standards/ NCCLS (2005).

Das amostras produtoras de ESBL a maioria foi isolada de pacientes que estavam na Clínica Médica do hospital A (12,5%) e na Clínica Cirúrgica do Hospital C 33,3%. Para o hospital B, 14,3% das amostras foram isoladas de paciente que estava na UTI e 14,3% na Clínica Cirúrgica. A maior prevalência de amostras produtoras de ESBL ocorreu no hospital C (66,7%), seguido pelo hospital A (25,0%) e hospital B (28,6%), conforme demonstrado na Tabela 6.

**TABELA 6.** Distribuição das amostras de *Klebsiella* spp. produtoras e não produtoras de ESBL, por unidade de internação, coletadas nos Hospitais A, B e C em Goiânia no período entre janeiro de 2005 a maio de 2006

Unidade de Internação	Hospital A N=40		Hospital B N=7		Hospital C N=21	
	Produtoras de ESBL	Não produtoras de ESBL	Produtoras de ESBL	Não produtoras de ESBL	Produtoras de ESBL	Não produtoras de ESBL
UTI	3(7,5)	3(7,5)	1(14,3)	1(14,3)	2(9,5)	-
CC	2(5,0)	9(20,5)	1(14,3)	-	7(33,3)	-
CM	5(12,5)	18(45)	-	4(57,1)	5(24,8)	7(33,3)
Total	10(25)	30(75)	2(28,6)	5(71,4)	14(66,7)	7(33,3)

Legenda: Hospital A – Hospital especializado em oncologia, Hospital B – Hospital Universitário, Hospital C – Hospital Geral, UTI - unidade de terapia intensiva, CM - clínica médica, CC - clínica cirúrgica.

#### **4.4 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados *in vitro* das amostras clínicas de *Klebsiella* spp. em três centros participantes**

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Klebsiella* spp. foi realizada pelo método automatizado utilizando o MicroScan WalkAway (Dade Bering, USA). As taxas de sensibilidade aos diversos antimicrobianos podem ser vistos na tabela 7, que mostra a variação da sensibilidade às diferentes classes testadas. As 7 amostras de *K. oxytoca* foram 100% sensíveis a todos os antimicrobianos testados, exceto à ampicilina que não apresentou atividade contra nenhuma cepa. As 61 amostras de *Klebsiella pneumoniae* avaliadas tiveram baixas taxas de sensibilidade às penicilinas. A ampicilina teve a pior taxa de sensibilidade dentre os antimicrobianos testados, 2(3,3%). Porém a taxa de sensibilidade a este antimicrobiano aumentou após sua associação ao sulbactam (54,1%). Para a associação amoxicilina/ácido clavulânico a taxa de sensibilidade foi ainda maior (73,8%). Já o composto ticarcilina/ácido clavulânico apresentou taxa de sensibilidade de 60,7%.

Dentre as cefalosporinas a cefalotina teve o pior padrão de sensibilidade 50,8%, seguido pela cefazolina 52,5%. A cefpodoxima apresentou 27,9% de sensibilidade. A ceftriaxona teve a maior taxa de sensibilidade dentre as cefalosporinas de terceira geração (65,6%), seguida pela ceftazidima (62,3%) e cefotaxima (55,7%). A cefepima apresentou taxa de sensibilidade de 57,4%. O aztreonam teve maior taxa de sensibilidade que as cefalosporinas (70,5%) e somente o imipenem apresentou 100% de atividade sobre as amostras estudadas.

Os aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e tobramicina apresentaram respectivamente 70,5%; 63,9% e 67,2% de sensibilidade nas amostras testadas. E dentre as quinolonas testadas a levofloxacina demonstrou a maior atividade (68,9%) que as demais e a associação trimetropina/sulfametoxazol foi ativa contra 52,5% das amostras.

**TABELA 7.** Perfil de sensibilidade *in vitro* de 61 amostras de *Klebsiella pneumoniae* aos antimicrobianos, coletadas nos Hospitais A, B e C em Goiânia entre janeiro de 2005 a maio de 2006

<i>Antimicrobianos</i>	<i>Sensível</i> N (%)	<i>Intermediário</i> N (%)	<i>Resistente</i> N (%)
AMP	2(3,3)	8(13,1)	51(83,6)
AST	33(54,1)	3(4,9)	25(41,0)
PIP	25(41,0)	5(8,2)	31(50,8)
PTZ	42(68,9)	3(4,9)	16(26,2)
AMC	45(73,8)	11(18,0)	5 (8,2)
TIM	37(60,7)	10(16,4)	14(22,9)
CFZ	32(52,5)	1(1,6)	28(45,9)
CFT	31(50,8)	-	30(49,2)
CXM	39(63,9)	-	22(36,1)
CPD	17 (27,9)	-	44(72,1)
CRO	40(65,6)	-	21(34,4)
CTX	34(55,7)	-	27(44,3)
CAZ	38(62,3)	-	23(37,7)
CPM	35(57,4)	3(4,9)	23(37,7)
ATM	43(70,5)	-	18(29,5)
IMP	61(100)	-	-
AMI	43(70,5)	6 (9,8)	12(19,7)
GEN	39 (63,9)	1(1,6)	23(37,7)
TOB	41(67,2)	-	20(32,8)
LEV	42(68,9)	3(4,9)	16(26,2)
CIP	39 (63,9)	3(4,9)	19(31,1)
GAT	39 (63,9)	5(8,2)	17(27,9)
<b>TRS</b>	30(49,2)	-	31(50,8)

Abreviaturas: AMI -amicacina, AMC -amoxicilina/ácido clavulânico, AST - ampicilina/sulbactam, AMP- ampicilina, ATM - aztreonam, CFZ - cefazolina, CPM- cefepima, CTX- cefotaxima, CAZ- ceftazidima, CPD- cefpodoxima, CRO - ceftriaxona, CXM-cefuroxima, CFT - cefalotina, CIP - ciprofloxacina, GAT- gatifloxacina, GEN -gentamicina, IMP - imipenem, LEV - levofloxacina, PTZ - piperacilina/tazobactam, PIP - piperacilina, TIM - ticarcilina/ácido clavulânico, TOB - tobramicina, TRS - trimetropina/sulfametoxazol.

A sensibilidade a cefoxitina foi avaliada para as 33 cepas sugestivas de produção de ESBL e 100% destas amostras foram sensíveis a esta droga.

A comparação do perfil de sensibilidade das amostras produtoras e não produtoras de ESBL aos antimicrobianos testados é mostrada na tabela 8. As amostras não produtoras de ESBL foram mais sensíveis aos diversos antimicrobianos testados quando comparadas com as amostras produtoras de ESBL. Independente da produção de ESBL, o imipenem inibiu o crescimento de 100% das amostras.

Na associação piperacilina/tazobactam as taxas de resistência foram diferentes para não produtoras e produtoras de ESBL: 17,2% e 42,3%, respectivamente. As drogas associadas aos inibidores de ESBL, ácido clavulânico e tazobactam, tiveram a mesma atividade *in vitro* nas amostras produtoras de ESBL, mas apresentaram atividade diferente entre as não produtoras. Este fato pode não estar relacionado à atividade dos inibidores, mas a maior atividade da piperacilina que da amoxicilina contra as amostras de *K. pneumoniae*. A ticarcilina tem maior espectro de ação *in vitro* sobre as gram-negativas que a amoxicilina, entretanto, o composto ticarcilina/ácido clavulânico teve menor atividade que a associação amoxicilina/ácido clavulânico: 23,1% para produtoras e 5,7% para as não produtoras de ESBL para a primeira associação e 53,8% e 91,4% para a segunda, respectivamente. A atividade *in vitro* da associação ampicilina /sulbactam também foi testada, mas este foi o composto com pior desempenho dentre as associações penicilina/ inibidor de  $\beta$ -lactamase entre as amostras produtoras de ESBL com 84,6% de resistência e de 8,6% entre as não produtoras.

Nenhuma cefalosporina demonstrou atividade contra 100% das amostras. As taxas de resistência às cefalosporinas variaram entre amostras produtoras e entre as não produtoras de ESBL. A cefoxitina, aztreonam e cefpodoxima são bons marcadores para diferentes ESBLs e para amostras não produtoras de ESBLs. Nas amostras produtoras de ESBL 19(73,1%) foram resistentes à ceftazidima, 22(84,6%) à cefotaxima, 26(100,0%) à cefpodoxima e 20(76,9%) à ceftriaxona. Um resultado importante foi o perfil de sensibilidade à cefpodoxima: 100% das amostras não produtoras de ESBL foram sensíveis e 100% das amostras produtoras de ESBL foram resistentes. Todas as amostras não produtoras de ESBL foram sensíveis ao aztreonam,

mas 18(69,2%) amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram resistentes a esse antimicrobiano. Somente o imipenem apresentou 100% de sensibilidade em todas as amostras quando testadas *in vitro*.

A amicacina inibiu o crescimento de 88,6% das amostras não produtoras de ESBL e somente 46,1% das amostras produtoras. A gentamicina apresentou 85,7% de suscetibilidade para não produtoras e 30,8% para as amostras produtoras e a tobramicina inibiu 94,3% das amostras não produtoras de ESBL e 30,8% das produtoras.

As taxas de sensibilidade das fluoroquinolonas também foram menores entre amostras produtoras de ESBL: a ciprofloxacina inibiu 80,0% das amostras não produtoras e 42,3% das produtoras. A gatifloxacina inibiu 74,3% das cepas não produtoras e 50,0% das produtoras de ESBL. A levofloxacina teve o melhor desempenho entre as fluoroquinolonas testadas, com atividade contra 88,6% das amostras não produtoras e 50,0% das produtoras desta enzima, conforme mostra a Tabela 8.

**TABELA 8.** Comparação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos *in vitro* das amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras e não produtoras de ESBL, coletadas nos Hospitais A, B e C em Goiânia entre janeiro de 2005 a maio de 2006

Substratos	Amostras não produtoras de ESBL N=35(57,4%)			Amostras produtoras de ESBL N=26(42,6%)		
	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)
AMP	3(8,6)	8(22,8)	24(68,6)	-	-	26(100,0)
AST	30(85,7)	2(5,7)	3(8,6)	4(15,4)	-	22(84,6)
PIP	24(68,6)	3(8,6)	9(25,7)	2(7,7)	2(7,7)	22(84,6)
PTZ	28(80,0)	1(2,8)	6(17,2)	13(50,0)	2(7,7)	11(42,3)
AMC	32(91,4)	-	3(8,6)	14(53,8)	11(42,4)	1(3,8)
TIM	2(5,7)	32(91,4)	1(2,8)	6(23,1)	8(30,8)	12(46,1)
CFZ	28(80,0)	1(2,8)	6(17,2)	4(15,4)	-	22(84,6)
CFT	26(74,3)	2(5,7)	7(20,0)	3(11,5)	-	23(88,5)
CXM	34 (97,2)	-	1(2,8)	5(19,2)	-	21(80,8)
CPD	35 (100,0)	-	-	-	-	26(100,0)
CRO	34 (97,2)	-	1(2,8)	6(23,1)	-	20(76,9)
CTX	30(85,7)	-	5(14,3)	4(15,4)	-	22(84,6)
CAZ	31(88,6)	-	4(11,4)	7(26,9)	-	19(73,1)
CPM	31(88,6)	1(2,8)	3(8,6)	4(15,4)	2(7,7)	20(76,9)
ATM	35(100,0)	-	-	7(26,9)	-	18(69,2)
IMP	35(100,0)	-	-	26(100,0)	-	-
AMI	31(88,6)	-	4(11,4)	12(46,1)	6(8,8)	8(11,8)
GEN	30(85,7)	1(2,8)	4(11,4)	8(30,8)	-	18(69,2)
TOB	33 (94,3)	-	2(5,7)	8(30,8)	-	18(69,2)
LEV	31(88,6)	2(5,7)	2(5,7)	13(50,0)	1(3,85)	12(46,1)
CIP	28 (80,0)	1(2,8)	6(17,2)	11(42,3)	2(7,7)	13(50)
GAT	26 (74,3)	4(11,4)	5(14,3)	13(50,0)	1(3,85)	12(46,1)
TRS	21(60,0)	-	13(40,0)	2(7,7)	-	24(92,3)

Abreviaturas: AMI -amicacina, AMC - amoxicilina/ácido clavulânico, AST - ampicilina/sulbactam, AMP-ampicilina, ATM - aztreonam, CFZ - cefazolina, CPM- cefepima, CTX- cefotaxima, CAZ- ceftazidima, CPD- cefpodoxima, CRO - ceftriaxona, CXM-cefuroxima, CFT - cefalotina, CIP - ciprofloxacina, GAT- gatifloxacina, GEN-gentamicina, IMP - imipenem, LEV - levofloxacina, PTZ - piperacilina/tazobactam, PIP - piperacilina, TIM - ticarcilina/ácido clavulânico, TOB-tobramicina, TRS - trimetropina/sulfametoxazol. S-sensível, I- intermediário, R - resistente, ESBL-  $\beta$  - lactamase de espectro ampliado.



#### 4.5 Avaliação da variedade genética das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL coletadas no Hospital C

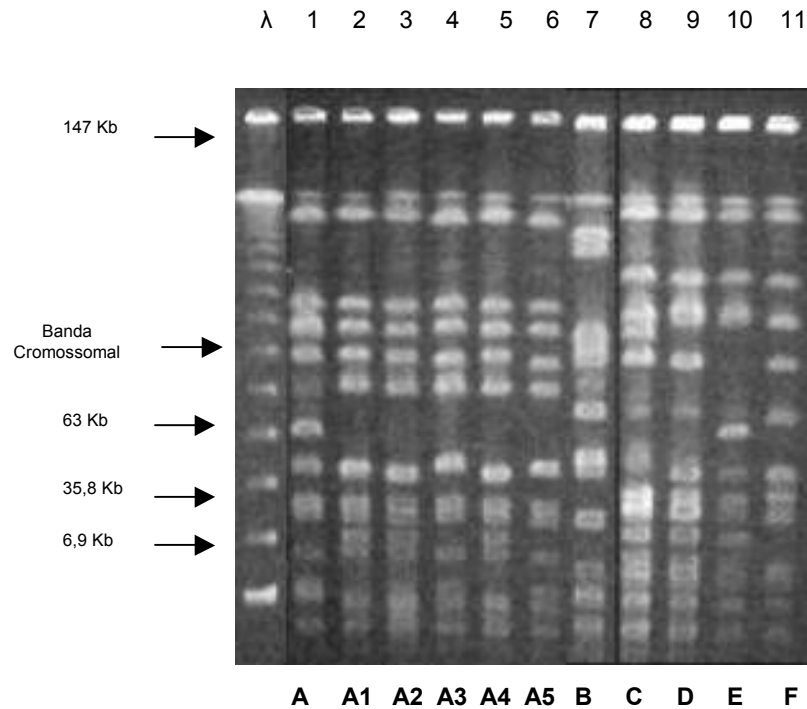
As 14 amostras de *K. pneumoniae* fenotipicamente confirmadas como produtoras de ESBL provenientes do Hospital C foram submetidas à técnica de “Pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) para a análise de DNA cromossômico. Dessas 14 amostras, 11 (78,6%) foram tipáveis, pois três amostras (400, 568 e 355) não apresentaram padrão de resolução pela técnica de PFGE, apesar do teste ter sido repetido.

O resultado da tipagem molecular das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL está apresentado na figura 6 e demonstra que houve variedade genômica entre as amostras tipadas, as quais apresentaram 6 padrões diferentes. Os padrões A, A1, A2, A3, A4 e A5 mostraram similaridade. As demais amostras não demonstraram perfis relacionados. Os subtipos de um mesmo clone foram encontrados na clínica médica e clínica cirúrgica (tabela 9).

**TABELA 9.** Padrões encontrados através da técnica de PFGE nas amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL coletadas no Hospital C de Goiânia entre janeiro de 2005 e maio de 2006

Amostra	Unidade de internação	Sítio de isolamento	Padrão do PFGE
206	CM	Urina	A
227	CM	Urina	A1
288	CM	Urina	A2
314	CC	Urina	A3
315	CC	Urina	A4
350	CC	Urina	A5
365	CC	Urina	B
381	CC	Sangue	C
400	UTI	Urina	NT
416	CC	Ferida	D
455	CM	Urina	E
567	CC	Urina	F
568	CM	Urina	NT
355	CC	Sangue	NT

Legenda: CM - clínica médica, CC - clínica cirúrgica, UTI - unidade de terapia intensiva, NT – não tipada, PFGE - Pulsed-field gel electrophoresis.



**FIGURA 6.** Padrões de PFGE das seguintes amostras (coluna - número da amostra): de PFGE das seguintes amostras (coluna - número da amostra): λ - marcador de massa molecular, 1- 206, 2 -227, 3 – 288, 4 – 314, 5 - 315, 6 - 350, 7 - 365, 8 - 381,9 - 416, 11 - 455, 12 – 567.

## 5 DISCUSSÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde são ameaça, sobretudo as causadas por microrganismos multirresistentes. A resistência aos antimicrobianos, as quais foram reconhecidas há mais de 50 anos, continua ser a principal causa crescente de morbidade, mortalidade, tempo de internação e necessidade do uso de antimicrobianos mais tóxicos e mais caros, o que resulta no aumento dos custos hospitalares (Jarvis, 1996; Shlaes, et al, 1997; Murthy, 2001; Patterson, 2001).

A prevalência de microrganismos resistentes às múltiplas classes de antimicrobianos aumentou tanto no meio ambiente hospitalar quanto na comunidade, como foi demonstrado em estudos realizados em diferentes países. A consequência das mudanças nas características genotípicas dos microrganismos impõe limitações quanto às opções terapêuticas (Kollef et al, 1999; Sader, 2000; Lynch, 2001; Fridkin et al 2002; Babic et al, 2006; Al-Tawfiq, 2006).

Neste estudo a distribuição da taxa de infecção por *Klebsiella* spp. entre os centros envolvidos foi variável. Considerando-se a natureza das instituições e das condições clínicas dos pacientes ali tratados esperava-se que a ocorrência de infecção por este microrganismo fosse maior do que o encontrado. Estudos demonstram que as taxas de infecções são maiores nos hospitais de ensino e nos hospitais que tratam de pacientes com doenças graves e imunossuprimidos como demonstrado nos estudos de Pittet et al (1995), Umed (2002) e Patterson et al (2003). Ao se distribuir as infecções hospitalares causadas por *Klebsiella* entre as unidades de internação, verificou-se que as taxas foram maiores na clínica médica (57,4%), seguida pela clínica cirúrgica (27,9%) e UTI (14,7%) (Tabela 2). Outros estudos demonstram que a UTI é a unidade de internação com as maiores taxas de infecção por este microrganismo. Possivelmente a maior prevalência na clínica médica e cirúrgica encontrada neste estudo se deva a transferências de pacientes provenientes de UTIs ou pelo reduzido número de leitos de UTIs em hospitais brasileiros, o que faz com que pacientes com quadros graves recebam cuidados intensivos em enfermarias. Nas UTIs as taxas de infecção são 5 a 10

vezes maiores do que as encontradas em outras unidades de internação (Piroth et al, 1998; Kollef et al, 1999; Weber et al, 1999; Gales et al, 2000; Lubowski et al, 2001; Murthy, 2001; Alp et al, 2004). Assim, a prevalência de amostras provenientes da clínica médica e cirúrgica sugere que o número reduzido de isolados pelos centros participantes esteja subestimado, possivelmente pela coleta não adequada do material clínico ou por falhas no isolamento e identificação do microrganismo infectante. Nem todos os profissionais da microbiologia despertaram para a importância dos programas de vigilância epidemiológica e o fornecimento de amostras para pesquisas com vistas a identificar a prevalência de microrganismos multirresistentes.

*Klebsiella pneumoniae* constitui uma importante causa de infecções comunitárias e hospitalares sendo responsável por 6 a 8,6% de todas as pneumonias comunitárias, sendo 35-65% destas infecções letais (Marra 2002). As infecções hospitalares causadas por *Klebsiella* spp. podem acometer diferentes sítios corpóreos por se tratar de um patógeno oportunista isolado predominantemente de indivíduos hospitalizados, com o sistema imune debilitado e que possuem doenças de base grave como *diabetes mellitus* ou obstrução pulmonar crônica (Garner et al, 1988; Pittet et al, 1995; Marra, 2002; Wong-Beringer et al, 2002; Paterson et al, 2003). *K. pneumoniae* está entre os 10 patógenos mais prevalentes que causam infecção da corrente sanguínea nos Estados Unidos e no Canadá (Pfaller et al, 1992).

Na América Latina, este é o terceiro patógeno mais prevalente isolado no trato respiratório de paciente hospitalizado com pneumonia e corresponde a 12% do total de patógenos isolados (Gales et al, 1997). Neste estudo, os principais sítios de isolamento de *Klebsiella* spp. foram aqueles relacionados com as infecções urinárias e da corrente sanguínea (tabela 3). As infecções das vias urinárias estão mais relacionadas com a realização de procedimentos invasivos, como o uso de sonda vesical de demora, tanto em pacientes internados em UTI quanto em enfermarias, mas a alta prevalência das infecções da corrente sanguínea entre os pacientes em tratamento na clínica médica e cirúrgica não é tão comum quanto as que ocorrem em UTI. Portanto, este resultado desperta para a necessidade de se conhecer nestas unidades os potenciais fatores de risco relacionados com as infecções da corrente sanguínea, a fim de que medidas específicas de controle de infecção possam

ser adotadas por estas instituições. Nas UTIs estes fatores de risco já são bem conhecidos e estão relacionados à gravidade das condições clínicas dos pacientes, os quais geralmente são submetidos a diversos procedimentos invasivos, favorecendo o acesso dos microrganismos ao sistema vascular (Pittet et al, 1995; Peña et al, 1998; Richards et al, 1999).

Diversos estudos têm demonstrado que *Klebsiella* spp. é um importante patógeno relacionado com infecções respiratórias, entretanto, neste estudo a prevalência foi tão baixa neste sítio quanto ao encontrado em infecções de outros sítios (tabela 3)(Paterson et al, 2001; Alp et al, 2004; Paterson, 2006). A baixa prevalência neste sítio poderia ser justificada pelo fato da maior parte das amostras serem provenientes da clínica médica, unidade cujos pacientes estão menos expostos aos fatores de risco para aquisição de infecções, tais como intubação, uso de ventiladores mecânicos e cateteres centrais, exposição prévia a antibióticos de amplo espectro e menor duração do período de hospitalização (Shlaes et al, 1997; Piroth et al, 1998; Kollef et al, 1999; Sifuentes-Osornio, 2000; Bradford, 2001; Murthy, 2001; Sader et al, 2001; Alp et al, 2004).

A emergência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL já foi relatada em todo o mundo como importante causa de infecção hospitalar. Nos hospitais americanos e canadenses a taxa de infecção por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL é inferior a 4%, na Europa varia entre 15-20% (Jacoby & Medeiros 1991; Gales et al, 1997; Sader et al, 2000; Paterson et al, 2001; Sader, 2001). No Brasil, não existem estudos envolvendo todo território nacional com vistas a identificar os mecanismos de resistência dos microrganismos envolvidos com as infecções hospitalares e a prevalência dos mesmos. Há apenas iniciativas de estudos isolados em algumas regiões do país (Gales, 1997; Marra, 2002; Carmo Filho, 2003; Sousa Jr et al, 2004).

No estudo realizado em três hospitais de Goiânia a prevalência de linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foi de 38,2%. Esta prevalência não é tão discrepante da encontrada nos hospitais brasileiros que é de 42.1% e reforçam que a prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL é muito preocupante no Brasil. Estes dados alertam para a necessidade de medidas de controle da emergência de bactérias multirresistentes e bem como a adoção de medidas de barreiras que devem ser instituídas para evitar a

disseminação de microrganismos com este mecanismo de resistência nas instituições hospitalares (Gales et al, 1997; Sader, 2000; Sader et al, 2001). Quando se avalia a distribuição destas amostras entre os hospitais envolvidos observa-se que houve variação na prevalência entre os mesmos. Por estes resultados podemos inferir que dada à natureza das instituições envolvidas no estudo a prevalência de linhagens produtoras de ESBL seria tão elevada no hospital universitário e no hospital especializado em tratamento oncológico quanto à encontrada no hospital geral (Sader, 2000; Bradford, 2001). Outros estudos brasileiros têm confirmado os resultados obtidos pelo SENTRY e apresentaram taxas similares de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Dentre os estudos realizados no Brasil destacam-se os realizados no Hospital São Paulo em diferentes períodos e em diversas unidades de internação. O estudo realizado em 1997 envolvendo várias unidades de internação do Hospital São Paulo identificou que 39% das amostras de *K. pneumoniae* eram produtoras de ESBL, outro estudo realizado em 2001 identificou uma taxa ainda maior destes microrganismos (48,4%). Na mesma instituição, em 2002, utilizando-se isolados de corrente sangüínea identificou-se que a prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foi de 39%. No ano de 2003, utilizando-se isolados de sítio estéril de pacientes em tratamento na UTI adulto e neonatal foram identificadas taxas de prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL de 69% e 46,2%, respectivamente (Gales, 1997; Sader et al, 2001; Marra, 2002; Carmo Filho 2003; Sader, 2005).

As infecções causadas por estes microrganismos são preocupantes porque estes podem adquirir resistência a múltiplas drogas (Hanson et al, 1999; Guzmán-Blanco et al, 2000; Bush, 2001; Thomson, 2001; Babic, 2006). Soma-se a isso o fato de *K. pneumoniae* ser importante fonte de transmissão de resistência entre microrganismos de espécies não correlacionadas. Dessa maneira há risco de recorrência de surtos e/ou a expressão de outros mecanismos de resistência a outras classes de antimicrobianos (Buisso et al, 1987; Asensio et al, 2000; Gniadkowski, 2001).

O conhecimento da prevalência dos mecanismos de resistência entre os microrganismos responsáveis pelas infecções hospitalares é de fundamental importância, tanto para a escolha adequada da terapêutica antimicrobiana empírica quanto para o planejamento de medidas efetivas de controle destas

infecções e a identificação de surtos. Todavia a prevalência de bactérias produtoras de ESBL é desconhecida ou às vezes é subestimada em muitas instituições hospitalares. Os resultados encontrados neste estudo são preocupantes, sobretudo, se for considerado que muitas infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL podem ter sido tratadas inadequadamente, pois este e outros mecanismos de resistência podem não ser detectados pelos testes de sensibilidade realizados rotineiramente nos laboratório de microbiologia clínica (Katsanis et al, 1994; Thomson et al, 1996; Gales, 1997).

Estas falhas ocorrem porque ainda não há padronização de um teste laboratorial prático, com boa sensibilidade e de fácil aplicação na rotina laboratorial. O CLSI padroniza a metodologia de detecção de ESBL somente para *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* e assim muitos laboratórios clínicos têm dificuldades para detectar amostras que expressam este mecanismo de resistência (Katsanis et al, 1994; Thomson et al, 1996; Schwaber et al, 2004).

Neste estudo cinco substratos  $\beta$ -lactâmicos foram testados para detectar as amostras produtoras de ESBL, conforme orientação do CLSI (2005). Os substratos que melhor detectaram o fenótipo ESBL entre os isolados de *K. pneumoniae* foram cefotaxima e cefpodoxima (tabela 5). Estes resultados são semelhantes aos descritos em outros estudos (Thomson et al, 1999; Bradford, 2001). A potência e afinidade de cada ESBL pelos diferentes substratos variam e causam dificuldades na detecção e caracterização de isolados produtores desta enzima (Katsanis et al, 1994; Tenover et al, 1999). A detecção presuntiva do fenótipo ESBL pode sofrer variações quanto ao tipo de substrato, de acordo com a prevalência da ESBL produzida pelos microrganismos e podem ter variações regionais. Estudos têm mostrado grandes diferenças de suscetibilidade aos antimicrobianos em diferentes hospitais e a utilização de dados de suscetibilidade de outro hospital deve ser desencorajada na escolha da terapêutica, que deverá ser guiada por testes de suscetibilidade de cada instituição (Kollef et al, 1999; Lubowski, 2001; Sader et al, 2001). Outro fator que dificulta a detecção de ESBL é a baixa síntese desta enzima como ocorre em isolados produtores de TEM-7 e TEM-12. O uso de uma variedade maior de substratos permitiu a identificação de maior número de amostras produtoras (Jacoby & Medeiros 1991; Bell et al, 2002).

A evolução dos microrganismos bacterianos tem gerado uma diversidade de mecanismos de resistência para se adaptarem às diferentes pressões seletivas ocorridas no meio ambiente intra e extra-hospitalares. O uso clínico generalizado dos antimicrobianos comercialmente existentes tem mobilizado mecanismos para neutralizar o impacto produzido por eles e poucos agentes ainda são ativos contra estes microrganismos (Rice, 2001; Babic, 2006). Diante da redução das opções terapêuticas é importante que se conheça os tipos de enzimas presentes para que se possa orientar a terapêutica apropriada. Os testes de suscetibilidade mostraram que as taxas de resistência aos antimicrobianos foram maiores entre as amostras produtoras de ESBL, demonstrando a importância da distinção das cepas produtoras e não produtoras desta enzima. Cada vez torna-se mais difícil para o laboratório de microbiologia clínica identificar não somente os diferentes mecanismos de resistência, mas também a produção de múltiplas  $\beta$ -lactamases pelo mesmo microrganismo sem conduzir a elaborados testes secundários com expressivo aumento nos custos (Bush 2001).

Neste estudo o perfil de sensibilidade das amostras de *K. oxytoca* aos antimicrobianos foi maior que das amostras de *K. pneumoniae*, demonstrando sensibilidade de 100% a todos os antimicrobianos testados, com exceção da ampicilina. As amostras de *K. pneumoniae*, entretanto, demonstraram baixa suscetibilidade a todas as classes de antimicrobianos, exceto aos carbapenêmicos. Dentre as associações de inibidores de  $\beta$ -lactamase e penicilinas a combinação de amoxicilina/ácido clavulânico teve a maior atividade. Porém, quando as amostras produtoras e não produtoras de ESBL foram avaliadas separadamente, a sensibilidade foi maior entre as amostras não produtoras de ESBL, mas não o suficiente para que estes antimicrobianos possam ser utilizados com segurança no tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Entretanto, a diminuição de sensibilidade às penicilinas quando associadas aos inibidores de  $\beta$ -lactamases em amostras produtoras de ESBL evidencia que a produção desta enzima não seja o único mecanismo de resistência das amostras estudadas. Assim a cefoxitina foi testada com intuito de detectar a possível produção de AmpC  $\beta$ -lactamase, mas todas as amostras testadas foram sensíveis a esta droga e foram também inibidas pelo ácido clavulânico, o que nos permite inferir que



possivelmente estas amostras não sejam produtoras de AmpC (Bonomo et al, 1992; Martínez-Martínez et al, 1996; Limaye et al, 1997; Gales, 1997; Bradford, 2001).

Há muitos relatos destacando a importância do uso de  $\beta$ -lactâmicos associados aos inibidores de  $\beta$ -lactamases como alternativa viável para o tratamento e profilaxia das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL direcionados por testes laboratoriais, por diminuírem a pressão seletiva e exercerem um efeito protetor para o aparecimento e disseminação de microrganismos produtores de ESBL, com destaque para a piperacilina/tazobactam. O uso destas associações promove ainda a diminuição na incidência de colonização por cepas produtoras de ESBL (Rice et al, 1996; Bradford, 2001; Patterson, 2001; Sader et al, 2001). Sabe-se que pacientes colonizados são importantes fontes de transmissão de microrganismos multirresistentes, principalmente entre pacientes em tratamento em UTIs (Flaherty & Weinstein, 1996; Shlaes, 1997; Piroth et al, 1998; Paterson & Bonomo, 2005).

Entretanto, estudos demonstram baixa atividade das associações  $\beta$ -lactâmicos associados aos inibidores de  $\beta$ -lactamases contra amostras produtoras de ESBL sendo os possíveis mecanismos envolvidos a hiperprodução de  $\beta$ -lactamases, o que desequilibraria a ação do inibidor de  $\beta$ -lactamase que estaria em menor concentração no espaço periplasmático; a perda de porinas; a produção de AmpC ou ainda a ocorrência de mutação capaz de fazer com que enzimas sensíveis se tornem resistentes (Bonomo, 1992; Babic et al, 2006; Paterson, 2006). Outros mecanismos que determinam a eficácia dos inibidores são a magnitude com que os antibióticos ou os inibidores induzem a atividade das  $\beta$ -lactamases e a eficácia do inibidor contra o tipo específico de  $\beta$ -lactamase produzida (Sousa Jr et al, 2004).

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos de amplo espectro das amostras produtoras de ESBL demonstraram baixa atividade destas drogas, notadamente das cefalosporinas e do aztreonam, dados similares aos encontrados em outros hospitais brasileiros localizados no Rio de Janeiro, Florianópolis e São Paulo em estudo realizado pelo SENTRY em 1998 (Gales et al, 1997; Sader, 2000). O uso de cefalosporinas de terceira geração, principalmente da ceftazidima, tem sido associado à emergência de bactérias

produtoras de ESBL, notadamente das gram-negativas. A ampla utilização destes antimicrobianos causa pressão seletiva, sendo este um dos principais fatores de risco para a aquisição de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL. O abuso de cefotaxima também exerce pressão seletiva, disseminando os plasmídeos contendo os genes *bla*CTX-M que conferem resistência a esta e a outras drogas entre patógenos entéricos (Meyer et al, 1993; Rahal et al, 1998; Tenover, 1999; Man et al, 2000; Sader, 2000; Lynch, 2001; Murthy, 2001).

Dentre as cefalosporinas analisadas, a cefepima apresentou boa atividade *in vitro* contra cepas não produtoras de ESBL, mas baixa atividade contra as amostras produtoras destas enzimas. A boa atividade desta droga é devida a rápida penetração desta pela membrana externa de bactérias gram-negativas, sua maior afinidade pelas PBPs que outras cefalosporinas e maior resistência a hidrólise. Contudo, amostras de *K. pneumoniae* mutantes deficientes de porinas podem apresentar aumento na resistência à cefepima (Sader & Jones, 1995; Sader et al, 1999). Apesar da maior permeabilidade da cefepima ao atravessar a membrana externa de bactérias gram-negativas e da estabilidade desta em amostras produtoras de ESBL a sua utilização para fins terapêuticos deve ser feita com restrições. Deve-se considerar a concentração a ser alcançada no sítio da infecção e em infecções onde o inóculo do agente infeccioso é grande e/ou onde a cefepima não atinge concentrações adequadas o seu uso não é recomendado (Jett et al, 1995; Sanders et al, 1996). Contudo, relatos de sucesso clínico com cefalosporina de amplo espectro no tratamento de infecções causadas por organismos produtores de ESBL têm sido reportados principalmente para infecções em sítios onde estes antimicrobianos podem atingir altas concentrações como na infecção do sistema urinário (Meyer et al, 1993).

Neste estudo não seria recomendado o uso de cefalosporinas de espectro ampliado contra microrganismos produtores de ESBL ainda que, *in vitro*, as cepas apresentassem sensibilidade a esta classe de antimicrobianos, pois *in vivo* poderia haver falha terapêutica, provavelmente pelo alto inóculo bacteriano (Rice et al, 1991; Patterson, 2000).

O imipenem foi a única droga que apresentou 100% de atividade nas amostras estudadas, independente da produção de ESBL. Este resultado também foi encontrado em outros estudos realizados no Brasil e em outros

países da América Latina, em que mais de 90% das amostras foi suscetível aos carbapenems (Gales et al, 2000). Em função da boa resposta terapêutica encontrada pelo uso de carbapenem no tratamento clínico de infecções por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, esta classe de antimicrobianos se tornou a opção terapêutica mais segura pela sua capacidade de penetrar rapidamente na célula bacteriana, devido ao tamanho, estrutura ziteriônica e conformação da molécula. Além disso, as moléculas dos carbapenems possuem alta afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina, são altamente estáveis à lise causada pela maioria das ESBLs e causam rápida hidrólise da célula bacteriana com liberação de baixos níveis de endotoxina (Jackson & Krop, 1992; Martínez-Martínez, 1996; Patterson et al, 1997; Edwards & Betts, 2000; Sifuentes-Osornio, 2000; Paterson, 2006).

A resistência aos carbapenêmicos é rara entre *Enterobacteriaceae*, contudo, o uso dos carbapenems deve se limitar aos tratamentos direcionados por testes laboratoriais, já que o uso generalizado destes agentes como tratamento empírico poderá selecionar clones de resistência também entre organismos apresentando co-resistência às quinolonas e aos aminoglicosídeos (Gales et al, 1997; Patterson, 2000; Gales, 2000; Sousa Jr et al, 2004). A resistência cruzada aos antimicrobianos de diferentes classes é igualmente decorrente da presença de múltiplos plasmídeos que carregam genes de resistência distintos (Jacoby & Sutton 1991; Lee et al, 1994; Bradford et al, 1997). Portanto, o conhecimento prévio do perfil de sensibilidade da microbiota hospitalar é importante para o estabelecimento do esquema de terapia empírica adequado, o que certamente contribuirá para redução da pressão seletiva e da mortalidade (Patterson et al, 1997; Kollef et al, 1999).

O tratamento clínico de infecções por microrganismos produtores de ESBL poderá utilizar drogas alternativas como os aminoglicosídeos, as fluoroquinonas e a trimetroprina/sulfametoxazol. Contudo, desde a introdução dos aminoglicosídeos para o uso clínico, a resistência bacteriana a essa classe de antimicrobianos tem sido relatada. Em nosso estudo, houve boa atividade desta classe de antimicrobianos entre as amostras não produtoras de ESBL, mas baixa atividade em produtoras destas enzimas. O principal mecanismo de resistência a estas drogas seria a produção de enzimas bacterianas, que se ligariam covalentemente ao antimicrobiano, modificando-o através de três

formas: acetilação, nucleotidilação e fosforilação. Porém, estudos têm demonstrado a existência da associação entre genes que codificam ESBL e genes que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos em plasmídeo conjugativo. A resistência à gentamicina ainda pode ocorrer por diminuição da permeabilidade da membrana ou por co-transferência da resistência por plasmídeos (Shaw et al, 1993; Patterson et al, 1997; Palucha et al, 1999; Villa et al, 2000).

Outra boa opção para o tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL são as fluoroquinolonas, que são drogas potentes e com boa atividade tanto contra microrganismos gram-negativos quanto contra gram-positivos. Porém, as taxas de resistência às fluoroquinolonas variam de um país para outro e dependem de fatores epidemiológicos locais sendo maiores em países em desenvolvimento devido ao uso de quinolonas menos ativas ou do uso da ciprofloxacina em dosagens baixas que podem selecionar mutantes. Dados do SENTRY (1998) mostram que na América Latina as taxas de suscetibilidade as fluoroquinolonas variam entre 71,3% e 74,2%, sendo estas taxas menores entre pacientes com infecções do trato urinário (Gales et al, 2000). Na Europa, no entanto, vários casos de resistência a estas drogas têm sido relatados, tanto em infecções hospitalares quanto em infecções comunitárias. Neste estudo as fluoroquinolonas seriam boa opção de tratamento somente nas infecções causadas por *K. pneumoniae* não produtoras de ESBL, visto que as amostras produtoras apresentaram baixa sensibilidade a estas drogas (Patterson et al, 1997; Lautenbach et al, 2001).

A resistência às fluoroquinolonas em *Enterobacteriaceae* pode produzir falha terapêutica e facilitar a seleção de bactérias exibindo alto grau de resistência às quinolonas como *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Para que haja redução da sensibilidade às fluoroquinolonas devem ocorrer mutações em seu sítio de ação (DNA-girase bacteriano e/ou topoisomerase IV) ou a dificuldade de acesso da droga ao seu alvo por alteração em porinas ou ainda ser mediada por plasmídeos contendo o gene qnr. A resistência à fluoroquinolona mediada por plasmídeos conjugativos foi documentada em um isolado clínico de *K. pneumoniae* produtora de ESBL coletado no Alabama,

EUA (Martínez-Martínez, 1996; Patterson et al, 1997; Martínez-Martínez et al, 1998; Jacoby et al, 2003).

Gales (1997) avaliou a sensibilidade de amostras de *K. pneumoniae* coletadas no Hospital São Paulo à ciprofloxacina e identificou que 100% das amostras eram sensíveis a esta droga, independente da produção de ESBL. Em nosso estudo, no entanto, 63,9% das amostras estudadas foram sensíveis a esta droga. As taxas de suscetibilidade a ciprofloxacina também foram menores em produtoras que não produtoras de ESBL: 42,3% e 80,0%, respectivamente. As altas taxas de resistência às fluoroquinolonas identificadas neste estudo sugerem que o uso de quinolonas menos ativas ou do uso da ciprofloxacina em dosagens baixas tenham selecionado cepas mutantes resistentes a estes antimicrobianos. Dentre as causas das falhas identificadas na terapêutica estão a automedicação, falhas na posologia, interrupção do tratamento e negligências na identificação laboratorial das amostras e seu perfil de suscetibilidade aos diversos antimicrobianos (Lautenbach et al, 2001).

Neste estudo, a análise do DNA cromossômico bacteriano realizado com as amostras produtoras de ESBL provenientes do Hospital C mostrou uma grande variedade genética entre cinco amostras (multiclinal) e similaridade entre seis amostras (clonal). Por questões de viabilidade não foi possível realizar a técnica de PFGE com as amostras provenientes dos outros dois hospitais, entretanto, a disseminação de clones resistentes deve ser investigada em cada instituição, visto que grande variedade genética entre os clones tem sido demonstrada em estudos de tipagem molecular, sugerindo seleção contínua de mutantes resistentes (Rahal et al, 1998; Gniadkiowski, 2001; Thomson, 2001; Sader, 2001).

A natureza clonal e multiclinal das infecções encontradas neste estudo foi descrita por outros pesquisadores os quais demonstraram que as infecções causadas por *K. pneumoniae* em UTIs podem ter características tanto clonal quanto multiclinal (Schiappa et al, 1996; Lucet et al, 1996; Rebuck et al, 2000; Patterson et al, 2000). A vigência da disseminação clonal de *K. pneumoniae* sugere que a transmissão foi cruzada, ou seja, que a disseminação destas amostras foi feita por uma fonte comum não identificada. Possivelmente, essa disseminação pode ter sido veiculada pelas mãos dos profissionais que prestaram assistência aos pacientes. A seleção de diferentes

clones de *K. pneumoniae* nas duas unidades também pode ter sido influenciada pela política de uso de antimicrobianos em vigência nas respectivas unidades.

O aparecimento de infecções de natureza clonal e multiclonal causadas por *K. pneumoniae* implica em um conjunto de ações que precisam ser implantadas como a modificação do uso de antimicrobianos que deverão ser específicos para cada instituição e a criação de programa de vigilância epidemiológica. Os critérios para o estabelecimento do uso racional de antimicrobianos devem ser pautados em características clínicas dos pacientes atendidos na instituição e pelo perfil epidemiológico dos microrganismos isolados. Deve ser reforçada entre os profissionais da assistência a estrita adesão aos procedimentos de controle de infecção, incluindo vigilância para linhagens bacterianas resistentes aos antimicrobianos, isolamento e barreiras para pacientes colonizados ou infectados, distribuição periódica dos dados sobre a sensibilidade bacteriana, campanhas educativas, a restrição do uso de antimicrobianos de amplo espectro, inclusive de cefalosporinas (ceftazidima), uso racional e rotativo de antimicrobianos, uso de terapia antimicrobiana combinada (Goldman et al, 1996; Strausbaugh et al, 1996; Shalae et al, 1997; Burgess, 1999; Rice, 1999; Yates, 1999).

A terapia combinada justifica-se porque uma classe de antimicrobiano por si só é improvável que elimine microrganismos cuja resistência seja mediada por plasmídeo, uma vez que este elemento genético pode conter vários genes que codificam a resistência para antimicrobianos distintos (Flaherty & Weinstein, 1996; Patterson et al, 1997; Patterson, 2000; Gales et al, 2002; O'Brien, 2002). A adoção de programas de vigilância epidemiológica de infecção hospitalar observando-se os diferentes padrões de resistência antimicrobiana de cada instituição permitirá que dados de cada hospital sejam utilizados não só no diagnóstico, mas também na escolha da terapêutica (Shlaes et al, 1997; Rahal et al, 1998; Lubowski et al, 2001; Tenover, 1999).

A detecção precoce de amostras produtoras de ESBL é de suma importância para se iniciar o tratamento adequado e a tomada de medidas de controle de disseminação destes patógenos em surtos comunitários e hospitalares. O grande desafio dos profissionais de saúde é o aprimoramento contínuo dos métodos de detecção, controle e tratamento das infecções.

## 6 CONCLUSÕES

1. A prevalência de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL é alta nos hospitais estudados: 25% no Hospital A; 28,5% no Hospital B e 66,7% no Hospital C.
2. As amostras de *Klebsiella pneumoniae* isoladas nos três hospitais apresentaram altas taxas de resistência aos antimicrobianos.
3. As amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL apresentaram taxas de resistência superiores às apresentadas pelas amostras não produtoras desta enzima.
4. O imipenem foi a droga mais ativa contra *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, pois apresentaram atividade contra 100% das amostras testadas *in vitro*.
5. As amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas no Hospital C apresentaram ampla variedade genética, demonstrando-se a disseminação dessas amostras foi clonal e policlonal.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alp E, Güven M, Yildiz O, Aygen B, Voss A, Doganay M. Incidence, risk factors and mortality of nosocomial pneumonia in Intensive Care Units: a prospective study. *Ann Clin Microbiol Antimicrobiol* 2004; 3:17-20.

Al-Tawfiq, JA. Increasing Antibiotic Resistance Among Isolates of *Escherichia coli* Recovered From Inpatients and Outpatients in a Saudi Arabian Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27(7):748-53.

Ambler, RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans Roy London Series B. Biological Science* 1980; 289:321-31.

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H et al. Convenient test for screening metallo betalactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2001:40-43.

Asencio A, Oliver A, Gonzáles DP, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Ros P, et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 2000; 30:55-60.

Babic M, Hujer AM, Bomono RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on  $\beta$ -lactamases. *Elsevier* 2006; 10:1016-32.

Babini G & Livermore DM. Are SHV  $\beta$ -lactamase universal in *K. pneumoniae*? *Antimicrob Agent Chemother* 2000; 8:2230-1.

Barbosa HM, Torres BB, Furlaneto MC. *Microbiologia básica*. Editora Atheneu, São Paulo, 1998.



Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Phaller MA, Jones RN. 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). *Diag Microb Infect Dis* 2002; 42:1-7.

Bonomo RA, Currier-McCumber C, Shlaes DM. OHIO-1  $\beta$ -lactamase resistant to mechanism based inactivators. *FEMS Microb Letters* 1992; 92:79-82.

Bonnet R, Sampaio J, Labia R, Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A novel CTX-M  $\beta$ -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agent Chemother* 2000; 7:1936-42.

Bonnet R, Sirot R, Sirot J. Early dissemination of CTX-M derived enzymes in South America. *Antimicrob Agent Chemother* 2002;2: 602-4.

Bradford PA, Urban C, Mariano N. Imipenem resistance in *K. pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agent Chemother* 1997; 41:563-9.

Bradford PA. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 14:933-51.

Buisson CB, Philippon A, Ansquer M, Legrand P, Montraveis F, Durval J. Transferible enzymatic resistance to third generation cephalosporin during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet* 1987; 342:193-8.

Burgess D. Princípios farmacodinâmicos dos tratamentos antimicrobianos na prevenção da resistência. *Chest* 1999;115:19S-23S.

Bush K & Sikes RB.  $\beta$ -lactamases inhibitors in perspective. J Antimicrob Chemother 1983; 11:97-107.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.

Bush K. Metallo beta-lactamases: a class apart. Clin Infect Dis 1998; 27 (suppl.1): 48-53.

Bush K. New  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32:1085 -9.

Carmo Filho JR. Correlação Epidemiológica, microbiológica e clínica das infecções hospitalares em Unidades de Terapia Intensiva causadas por *Klebsiella pneumoniae*. São Paulo; 2003 [Tese-Doutorado-Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina].

Casellas J. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) na Argentina. O problema de ESBL CTX-M-2 em Buenos Aires. In: 1º Simpósio ESBL: incidência, importância e soluções. Argentina; 2000.

Edwards JR & Betts MJ. Carbapenems: the pinnacle of the  $\beta$ -lactam antibiotics or room for improvement. J Antimicrob Chemother 2000; 45:1-4.

Essack S, Hall LM, Pillay DG, MCFayen ML, Livermore DM. Complexity and diversity of *K. pneumoniae* strains with ESBL isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. Antimicrob Agent Chemother 2001; 1: 88-95.

Flaherty JP & Weinstein RA. Nosocomial infection caused by antibiotic resistant organisms in the intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 1996; 17:236-48.

Fridkin SK, Hill HA, Volkova NV, Edwards JR, Lawton RM, Gaynes RP, et al. Temporal changes in prevalence of antimicrobial resistance in 23 U.S. Hospitals. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(7): 697-701.

Gales AC. Prevalência, sensibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado. São Paulo; 1997 [DISSERTAÇÃO – Mestrado – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina].

Gales AC, Bolmstrom A, Sampaio J, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL isolated in hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis* 1997; 1:196-203.

Gales AC, Jones RN, Gordon KA, Sader HS, Wilke WW, Beach ML et al. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998). *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:295-303.

Gales AC, Mendes RE, Carmo Filho JR, Sader HS. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastina: o laboratório necessita testar rotineiramente dois antimicrobianos? *J Braz Pat Med Lab* 2002; 38(1): 13-20.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*; 1988; 16:128–40.

Giamarellou H. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microb Infect* 2005; (suppl 4):1S-16S.

Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended spectrum  $\beta$ -lactamases producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 7:597-608.

Goering RN. Molecular epidemiology of nosocomial infections by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Cont and hosp Epidem* 1993; 14(10):595-600.

Goldmann AD, Durbin WA Jr, Freeman J. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis* 1981; 144: 449-59.

Guzmán-Blanco M, Casellas JM, Sader HS. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. *Emerg Re-emerg Dis in Latin America* 2000; 14(1): 67-81.

Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthod G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding extended spectrum  $\beta$ -lactamases and a plasmid-mediated AmpC. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44(3):377-80.

Heritage J, Zali F, Binzi D, Hawkey P. Evolution and spread of SHV extended spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:309 -18.

Huang H & Hancock RE. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1996; 178:3085-90.

Ikonomidis A, Tokatlido WD, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, et al. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla* VIM-1 metallo betalactamase gene. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (10): 5344-7.

Ingham E. *Enterobacteriaceae*; 2000. Disponível em <http://medic.med.uth.tmc.edu>. Consulta em out/2005.

Jacoby GA & Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New England J Med* 1991; 324: 601-12.

Jacoby GA & Medeiros AA. More extended spectrum  $\beta$ -lactamases Antimicrob Agent Chemother 1991; 35:1697-704.

Jacoby GA & Sutton L. Properties of plasmids responsible for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production. Antimicrob Agent Chemother 1991; 35:164-9.

Jacoby GA. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases and other enzymes providing resistance to oxymino  $\beta$ -lactams. Infect Dis North Amer 1997; 11:875-87.

Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemoter 2003; 47:559-62.

Jarvis WR. Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost and prevention. Infect Control Hosp Epidem 1996; 17:552-57.

Jett BD, Ritchie DJ, Reichley R, Bailey TC, Sahm DF. Susceptibility of extended spectrum  $\beta$ -lactamases producing organisms. Antimicrob Agent Chemother 1995; 39:1187-90.

Jones R. Incidência global, tipos e triagem de  $\beta$ -lactamases com espectro ampliado. *In*:1° Simpósio ESBL: incidência, importância e soluções. Argentina; 2000.

Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases. J Clin Microbiol 1994; 32:691-6.

Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type  $\beta$ -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. Antimicrob Agent Chemother 1995; 39:2593-601.

Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections. A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999; 115:462-74.

Koneman EW, Allen SD, Dowel Jr VR, Sommer HM. Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. *Enterobacteriaceae*. 5° ed. Rio de Janeiro; 2001 MDSI . p. 177-250.

Lahey Studies Clinic (on line). EUA, Outubro 2006. Disponibilidade e acesso: Internet <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.

Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended spectrum betalactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1288-94.

Lee KH, Hui KP, Tan WC, Lim TK. *Klebsiella* bacteremia: a report of 101 cases from National University Hospital, Singapore. *J Hosp Infect* 1994; 27:299-305.

Limaye AP, Gautam RK, Black D, Fritsche TR. Rapid emergence of resistance to cefepime during treatment. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 339-40.

Lincopan N, McCulloch J, Reinert C, Cassettari V, Gales AC, Mamizuka E. First isolation of metallo betalactamase producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005; 1: 516-9.

Livermore DM. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1991; 78:7-16.

Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.

Lubowski TH, Woon JL, Hogan P, Ching-Chang Hwang. Differences in antimicrobial susceptibility among hospitals in an integrated health system. *Infect Control Epidemiol* 2001; 22:379-82.

Lucet JC, Chevret S, Decré D, Vanjak D, Macrez A., Bédos JP, Wolf M, Regnier B.

Outbreak of multiply resistant Enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factor for acquisition. *Clin Infect Dis* 1996;22:430-36.

Lynch JP. Antimicrobial resistance. It's time to reverse the trend. *Chest* 2001; 119:371S-2S.

Madson B, Ofek I, Clegg S, Abraham SN. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. *Infect Immun* 1994; 62: 843-8.

Man P, Verhoeven BAN, Verbrugh HA, Vos MC, Van den Anker JN. An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *Lancet* 2000; 355:973-8.

Marra AR. Análise dos fatores de risco relacionados à letalidade das infecções da corrente sanguínea hospitalares por *Klebsiella pneumoniae*. São Paulo; 2002 [Dissertação: Mestrado-Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina].

Martínez-Martínez L, Hernández-Alléz S, Albertí S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA. *In vivo* selection of porin deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agent Chemother* 1996; 40:342-8.

Martínez-Martínez L, García I, Ballesta S, Benedi VJ, Hernández-Allé S, Pascual A.

Energy dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone resistant *K. pneumoniae* strains. *Antimicrob Agent Chemother* 1998; 42:1850-2.

Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martinez R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. Intern Microbiol 2004; 7: 261-8.

Medeiros AA. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: extended spectrum  $\beta$ -lactamases have arrived in North America. Ann of Inter Med 1993; 119(5):428-30.

Meyer KS, Urban C, Eagan J, Berger BJ, Rahal JJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection resistant to late generation cephalosporins. Ann Inter Med 1993; 119:353-8.

Murthy R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. Chest 2001; 119(2): 405S-11S.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) – Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. 1<sup>st</sup> ed. Approved standard M100-S12. Wayne PA, 2002.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) – Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15<sup>o</sup> suplemento informativo. Padrão 100 -S15. Wayne PA, 2005.

Nicolas-Chanoine MH. Impacto de  $\beta$ -lactamases no uso clínico de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Intern J Chemother Ag 1996; 7 (suppl.):5-14.

Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science 1994; 264:382-8.

O'Brien TF. Emergence, spread and environmental effects of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. Clin Infect Dis 2002; 34:S78-S84.



Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by Amp C producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agent Chemother 2004; 48 (10): 3720-8.

Page MI. Understanding metallo- betalactamases. American Society for Microbiol; 2002; 20:1609-17.

Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing organism of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. J Antimicrob Chemother 1999; 44:489-99.

Patterson JE, Hardin TC, Kelly CA, Garcia RC, Jorgensen JH. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol 2000; 21:455-8.

Paterson DL, Ko W-C, Gotteberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. Antimicrob Agent Chemother 2001; 39: 2206–12.

Paterson DL & Bonomo R. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL): a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18 :( 4) 657-86.

Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Infect Control 2006; 34:S20-8.

Patterson JE, Rech M, Jorgensen JH. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases: dilemmas in detection and therapy. Antimicrob Infect Dis Newsletter 1997; 16:57-60.

Patterson JE.  $\beta$ -lactamases com espectro ampliado (ESBLs): intervenções bem sucedidas, controle e prevenção. *In*: 1º Simpósio ESBL: Incidência, importância e soluções. Argentina, 2000.

Patterson JE. Is there an effect on antimicrobial resistance? *Chest* 2001; 119:426S-30S.

Payne DJ, Cramp R, Winstanley DJ, Knowles DJ. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam and tazobactam against clinically important  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1994; 38:767-72.

Peleg A, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene IMP-4 among gram negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; 45(11): 1549-56.

Penã C, Piyol M, Ardanuy C, Ricard A, Pallares R, Liñares J, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1998; 1:53-8.

Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS. Molecular Biology – PFGE. Analysis of chromosomal fragments. *In*: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Handbook*. Washington, ASM Press 1992. P.10.5.C1 – 10.C.11.

Pfaller AM, Jones RN, Doern GV, Kugler K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agent Chemother* 1998; 42:1762-70.

Philippon A, Labia R, Jacoby GA. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1989; 33:1131-6.

Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13 (suppl.1):S17-S29.

Pittet D, Wenzel, RP. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality and contribution to total deaths. Arch Intern Med 1995; 155: 1177-84.

Piroth L, Auber H, Doise JM, Vincet-Martin M. Spread of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: are  $\beta$ -lactamase inhibitors of therapeutic value? Clin Infect Dis 1998; 27:76-80.

Podschun R, Penner P, Ullman U. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. Microb Path 1992; 13:371-9.

Podschun R & Ullman U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology taxonomy, typing, methods and pathogenicity factors. Clin Microbiol Ver 1998; 11 (4): 589-603.

Poirel L, Naass T, Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. CTX-M type extended spectrum betalactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. Antimicrob Agent Chemother 2001; 44(4) 3355-61.

Poirel L, Heriter C, Podglajin I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *K. pneumoniae* of a chromosome encoded SHV  $\beta$ -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. Antimicrob Agent Chemother 2003;47(2) 755-8.

Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleki L, Tokattidou D, Spanakis N, Maniatis A et al. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. Antimicrob Agent Chemother 2005; 49(12) 5153-6.

Rahal JJ, Urban CU, Horn D, Freeman K, Segal-Maurer S, Maurer J et al. Class restriction of cephalosporin use control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. JAMA 1998; 14:1233-7.

Rebuck JA, Olsen KM, Fey PD, Langnas NA, Rupp ME. Characterization of an outbreak due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. Clin Infect Dis 2000; 31:1368-72.

Rice LB, Yao DC, Klimm K, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC. Efficacy of different  $\beta$ -lactams against an extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the rat intra-abdominal abscess model. Antimicrob Agent Chemother 1991; 34: 2193-9.

Rice LB, Carias LL, Bonomo RA, Shlaes DM. Molecular genetics of resistance to both ceftazidime and  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations in *Klebsiella pneumoniae* and *in vivo* response to  $\beta$ -lactam therapy. J Infect Dis 1996; 173:151-8.

Rice LB. Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. Pharmacotherapy 1999; 19(8):120S-8S.

Rice LB. Evolution and clinical importance of extended spectrum  $\beta$ -lactamase. Chest 2001; 119: 391S-5S.

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. Pediatrics 1999; 103:1-7.

Richmond MH & Sykes RB. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their physiological role. Adv Microbiol Physiol 1973; 9: 31-88.

Roolins DM & Joseph SW. *Enterobacteriaceae*, 2000. Disponível em <http://medic.med.utm.tmc.edu>. Consulta em outubro de 2005.

Rossi F & Andreazzi D. Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma. Ed. Atheneu. São Paulo, 2005.

Rother ET & Rangel MEB. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo, 2001.

Sader HS, Sampaio JLM, Zaccoli C, Jones RN. Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian medical centers. Braz J Infect Dis 1999; 3:63-79.

Sader HS. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. Braz J Infect Dis 2000; 4(2): 91-9.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. Braz J Infect Dis 2001; 5(4):200-14.

Sader HS, Jones RN, Andrade Barocchi S, Biedenbach DJ, SENTRY Participants (LATIN AMERICA) - Four year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteremia from bloodstream infections in Latin America Medical Centers. Diag Microbiol Infect Dis 2002; 44 (3) 273-80.

Sader HS, Jones RN, Dowzicky MJ, Fritsche TR. Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. Diag Microbiol Infect Dis 2005; 52(3):203-8.

Sahly H, Aucken H, Benedi VJ, Forestien C, Fussing V, Hansen DS et al. Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by ESBL strains of *Klebsiella pneumoniae*. Pubmed-Medline University Hosp Schleswig Hotstein, 241105 Liel Germany, 2002.

Sanders CC & Sanders WE Jr.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15:824-39.

Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM et al. Detection of extended spectrum betalactamases producing members of the family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL test. *J Clinical Microbiol* 1996, 34:2997-3001.

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside modifying enzymes. *Microbiol Ver* 1993; 57:138-63.

Schiappa DA, Hayden MK, Matsushek MG, Hashemi, FN, Sullinvan J, Smith KY et al. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: A case-control and molecular epidemiology investigation. *J Infect Dis* 1996; 174:529-36.

Shlaes DM, Gerding DN, John JF, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA et al. Society for healthcare epidemiology of America and Infectious Disease Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect Contr Epid* 1997; 18:275-91.

Shukla I, Tiwari R, Agrawal M. Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital. *Indian J Medical Microbiol* 2004; 22 (2):87-91.

Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan Jr JE et al. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended spectrum  $\beta$ -lactamase in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 294-8.

Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for meta-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12) 5407-13.

Sifuentes-Osornio J. Extended-spectrum betalactamases (ESBL) na América Latina: seu impacto clínico. *In*: 1º Simpósio ESBL: Incidência, importância e soluções. Argentina; 2000.

Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, Gerbaud G. *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae* producing novel plasmid mediated  $\beta$ -lactamases markedly active against third generation cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1988; 10 (4).

Strausbaugh LJ, Crossley KB, Nurse BA, Thrupp LD. Antimicrobial resistance in longterm care facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17: 129-40.

Sykes RB & Matthew M. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrobial Chemother* 1976; 2: 115 – 57.

Sousa Jr MA, Ferreira ES, Conceição GC. Betalactamases de espectro ampliado: um importante mecanismo de resistência bacteriana no laboratório clínico. *Newslab* 2004; 63:152-74.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2233-9.

Tenover FC, Mohamed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Survey of laboratories in Connecticut 1999; 37: 4065-70.

Thomson KS, Prevan AM, Sanders CC. Novel plasmid mediated  $\beta$ -lactamase in *Enterobacteriaceae*: emerging problems for new betalactam antibiotic. *Current Clin Infect Dis* 1996; 16:151-63.

Thomson KS, Sanders CC, Moland ES. Use of microdilution panels with and without  $\beta$ -lactamases inhibitors as phenotypic test for  $\beta$ -lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agent Chemother* 1999; 43:1393-1400.

Thomson KS. Controversies about extended spectrum  $\beta$ -lactamases and Amp C. *Emerg Infect Dis* 2001; 7 (2).

Tortola MT, Lavilla S, Miró E, Gonzalez JJ, Lairosa N, Sabaté M et al. First detection of carbapenem hydrolyzing metallo enzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4):657-86.

Umed O. *Klebsiella* infections. Microbiology Gulbarga Univ. Disponível em: [http://: medicineinstantaccesstotheminds of medicine](http://:medicineinstantaccesstotheminds of medicine). Acesso em 7 de novembro de 2002.

Vercauteren E, Descheemaeker P, Leven M, Sanders CC, Goosen H. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum betalactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgium teaching hospital. *J Clin Microbiol* 1997, 35(9):2191-7.

Vila J & Marco F. Interpretative reading of the non-fermenting gram negative bacilli antibiogram. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2002; 20:304-10.

Villa L, Pezzella C, Tosini F, Visca P, Petrucca A, Carattoli A. Multiple antibiotic



resistance mediated by structurally related IncL/M plasmid carrying an extended spectrum  $\beta$ -lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2911-4.

Yates RR. Novas estratégias de intervenção para redução da resistência aos antibióticos. *Chest* 1999; 115:24S-7S.

Waley SG. An explicit model for bacterial resistance: application to betalactam antibiotics in microbiology. *Science* 1987;4:143-6.

Weber DJ, Raasch R, Rutala WA. Nosocomial infections in the ICU. The growing importance of antibiotic-resistant pathogens. *Chest* 1999; 115:34S-41S.

Wong-Beringer A, Hindler J, Loeloff M, Wuenan AM, Lee N, Pegues DA et al. Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. *Clin Infect Dis* 2002; 34:135-46.

**8 ANEXO: Artigo submetido à Revista Trabalho, Educação e Saúde/Fiocruz  
Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing  
Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) Isolated in two Hospitals in  
Goiânia/Brasil**

The prevalence of *Klebsiella pneumoniae* extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) has been increasing all over the world. ESBL production is usually associated with resistance to different antimicrobial agents. The purpose of this study was to evaluate the prevalence of *Klebsiella pneumoniae* ESBL producing strains, the *in vitro* susceptibility patterns and identify the genomic variability. The evaluated isolates of *Klebsiella* spp. causing urinary tract infection (UTI), bloodstream infection (BSI), lower respiratory tract infection (LRTI), Wound infection (WI), Marrow infection (MI), pleural liquid infection (PLI) and peritoneal liquid infection (PELI) in hospitalized patients, determined by collecting consecutive isolates from January 2005 to May 2006. All isolates were identified and susceptibility tested using MicroScan WalkAway (Dade Behring, USA). The ESBL phenotype test was performed by Disk Approximation test and the genomic variability of 14 strains of ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from one of the hospitals performed by Pulsed field gel electrophoresis (PFGE). A total of 61 bacterial strains were obtained and only one isolate per patient was selected for the study. The largest number of isolates were obtained from patients with UTI (36 cases), followed by BSI (17 cases) and LRTI (6 cases). The study showed high prevalence of ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* (25 % in hospital A and 66,7% in hospital C) and all of them showed high rates of antimicrobial resistance. The most active compound was imipenem (100% susceptibility *in vitro*). The PFGE test showed similarity in 5 strains and variability in 6 strains. The results emphasize the importance of detecting ESBL producing strains when initiating treatment.

**Key words:** Extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), *Klebsiella pneumoniae*,  $\beta$ -lactamases, bacterial resistance.

## Introduction

Antimicrobial resistance has increased dramatically in both nosocomial and community settings (Jones, 96).  $\beta$ -lactam antibiotics are the most widely used group of antimicrobial agents. The most common mechanism of resistance among gram-negative pathogens to  $\beta$ -lactam involves the synthesis of  $\beta$ -lactamases, especially of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). The emergence of ESBL producing organisms is serious concern worldwide and it is increasingly implicated in nosocomial infections. It is particularly important in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, which are able to produce large variety of these enzymes (4). ESBLs hydrolyse extended spectrum cephalosporins and monobactams, but are inhibited by  $\beta$ -lactamase inhibitors. The ESBL producing microorganisms can transmit this plasmid-mediated resistance to other species (3, 7, 13). ESBL producing pathogens represent an important source of morbidity, mortality, favors the appearance of multidrug resistant outbreaks and increase in the hospital costs (21,36). The treatment of infections due to ESBL producing strains is a serious concern by the fact that few antimicrobial agents remain active against these strains.

Although the infections caused by the ESBL producing strains are more often identified in Intensive Care Units (ICU) patients, they are often related in other hospital settings and even in communitary infections (1, 23). These strains are probably more prevalent than is currently recognized because they are not readily detected by susceptibility tests performed in routine clinical microbiology laboratories (17, 39, 44).

The spread of these multiresistant microorganisms is associated to the selective pressure caused by the overuse of broad spectrum cephalosporins, mainly ceftazidime. The ESBL production is also associated to cross resistance to other classes of drugs and can cause therapeutic failures and efforts to control outbreaks (23, 28). A better

understanding of the dissemination of bacterial resistance to antimicrobial agents is necessary to control the problem. This report will focus on the susceptibility profile of clinical isolates of ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients in two hospitals in Goiania/Brazil.

### **Material and Methods**

Bacterial strains: A total of 61 isolates were identified as *Klebsiella* spp.: 54 *Klebsiella pneumoniae* (88.5%) and 7 *Klebsiella oxytoca* (11.5%). The isolates were collected from January 2005 to May 2006 from hospitalized patients in two hospitals located in Goiânia/Brazil. Only one isolate per patient was selected for the study. All the strains were identified using the MicroScan WalkAway (Dade Behring, USA) in accordance with manufacture's instruction.

Susceptibility testing: Antimicrobial susceptibility testing was performed using MicroScan Walkway (Dade Behring, USA) and the Neg-Urine Combo 32 panels. The strains were categorized as susceptible, intermediate or resistant, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints (24). Cefoxitin was susceptibility tested to identify possible AmpC producing strains.

Confirmation phenotypes: The characterization of ESBL production was based on the susceptibility to five substrates (aztreonam, cefpodoxime, cefotaxime, ceftriaxone and ceftazidime), according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints. The confirmatory test was performed with 31 strains and used the Disk Approximation test, where a disk containing amoxicillin/clavulanate was placed as inhibitor of  $\beta$ -lactamase 20mm from the disks containing the oxymino- $\beta$ -lactam. Enhancement of the zone inhibition of the oxymino- $\beta$ -lactam caused by the clavulanate and the amoxicillin/clavulanate disk was considered as evidence of ESBL production (Picture 1).

Quality Control: *Escherichia coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ESBL NCCLS 700603.

DNA analysis: Selected multi-resistant isolates were tested by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in order to evaluate the method of dissemination of some resistant mechanisms in hospital C in Goiânia. Macrorestriction analysis of chromosomal DNA was done by PFGE by published procedures (Tenover et al, 1995) with Xba I (New England Biolabs, Boston, Mass). PFGE was run in a CHEF-DR II apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) with pulses ranging from 5 to 60 s at a voltage of 6V/cm for 23 hours at 14 °C for 20 hours.

## **Results**

The 61 *Klebsiella* spp. strains were obtained from hospitalized patients in two hospitals in Goiânia/Brazil from January 2005 to May 2006 in different hospital settings. Hospital A provided 40(65.6%) strains and hospital C 21(34.4%) strains. The distribution of species was: 54(88.5%) *K. pneumoniae* and 7 (11.5%) *K. oxytoca*. All *K. oxytoca* was provenient from Hospital A. The largest number of isolates were obtained from patients with UTI (36 cases), followed by BSI (17 cases), LRTI (6 cases), marrow infection (1 case), pleural liquid infection (1 case) and wound infection (1 case).

Table1 summarizes the susceptibility testing results obtained with *K. pneumoniae*. This pathogen showed very high rates of resistance to the majority of the antimicrobial agents tested. The combination of penicillins/ $\beta$ -lactamases inhibitors were not satisfactory. Piperacillin/tazobactam (68.9%) and amoxicillin/ clavulanate (73.8%) were the most active association against the studied *K. pneumoniae* strains. Cephalosporins and other  $\beta$ -lactams antimicrobials, except ampicillin, showed poor activity *in vitro*. Ceftazidime was the most active cephalosporin (62.3%) but cefpodoxime was active against only 27.9% of the studied strains. Aztreonam showed

good activity *in vitro* (70.5%). The most active compound against this pathogen was imipenem (100% susceptibility). The aminoglycosides activity varied from 63.9% for gentamicin to 70.5% for amikacin. The fluoroquinolones susceptibility rates ranged from 63.9% for ciprofloxacin and gatifloxacin to 68.9% for levofloxacin. The monobactam aztreonam, as well as other classes of antibiotics such as trimethoprim/sulphamethoxazole showed poor activity against our collection of isolates.

The best substrates to identify the ESBL phenotype were cefotaxime (100%), ceftriaxone (100%) and cefpodoxime (100%). The prevalence of ESBL producing *K. pneumoniae* isolates collected was 25% in hospitals A and 66.7% in Hospital C.

In general, the antimicrobial susceptibility patterns were higher among ESBL producing *K. pneumoniae* than among the non producing strains. The combination of penicillins/  $\beta$ -lactamase inhibitors showed better activity against ESBL producing strains than the non ESBL isolates what suggests that other resistance mechanisms may be involved. This study tested ceftazidime to detect the possible AmpC  $\beta$ -lactamase production, but none was confirmed (100% susceptible to ceftazidime). The production of ESBL among *K. pneumoniae* contributed significantly to the resistance of these isolates to third and fourth generations of cephalosporins, aminoglycosides and fluoroquinolones.

The overall antimicrobial susceptibility of *K. pneumoniae* producing ESBL was imipenem (100%) >piperacillin/tazobactam, levofloxacin, gatifloxacin (50.0%)>amikacin (46.1%) >gentamicin and tobramycin (30.8%)>amoxicillin-clavulanate(23.1%). The DNA analysis was performed with 14 ESBL producing strains collected from Hospital C because the prevalence of *K. pneumoniae* producing ESBL was higher in this hospital than the national average (42%). 6(42.8%) of the strains

showed similarity and 5(35.7%) of the strains showed great variability. Three strains (21.4%) did not present PFGE resolution pattern, even after repeating the test.

## **Discussion**

The prevalence of ESBL producing strains increases in hospital settings all over the world. These microorganisms are multidrug resistant and there is evidence they are emerging and spreading in the community as well. It demonstrates the importance of understanding the risk factors, evolution of this resistance and necessity of developing preventive measures.

The ESBL producing *K. pneumoniae* isolates present high prevalence, especially in ICU patients who acquire nosocomial infections at much higher rates than patients elsewhere in the hospital. The ICU patients present multiple risk factors, as invasive medical devices and immunosuppression. However, the studied strains were more prevalent in clinical settings. According to the isolation site the highest prevalence occurred in urinary tract and bloodstream infections. The respiratory tract infections prevalence were low, probably because these microorganisms were collected from clinical settings and there the patients are less exposed to risk factors as intubation, mechanical ventilation and prior broad spectrum antimicrobial use (1, 6, 18, 23, 29, 35, 38).

The susceptibility profile testing showed high rates of resistance to the different classes of antimicrobials and they can also present cross resistance to other classes of drugs. Among the combination of penicillin/ $\beta$ -lactamase inhibitors the highest susceptibility was identified in amoxicillin/ clavulanate. Aztreonam presented better activity (70.5%) than cephalosporins and the best performance among cephalosporins was identified in ceftriaxona (65,5%). The broad spectrum antimicrobial resistance rates

identified in this study were similar to the ones identified in other Brazilian hospitals located in Rio de Janeiro, Florianópolis and São Paulo by SENTRY-1998 (11, 34).

The epidemic rate of ESBL producing strains of *K. pneumoniae* and *E. coli* in Brazil is of great concern. Although the rates of producing strains may vary significantly from region to region or even from hospital to hospital within the same geographic region, the Brazilian rates are much higher than rates seen in most other parts of the world (35). The knowledge of the resistance mechanisms prevalence presented by nosocomial pathogens has important implications for both antibiotic therapy and planning effective control of outbreaks (3, 7, 13). In this study the ESBL producing *K. pneumoniae* showed resistance higher rates than the non ESBL ones. The combination penicillin/  $\beta$ -lactamases inhibitor showed lower activity among the ESBL producers than the non ESBL strains and it evidences that the ESBL production may be involved with other resistance mechanism, as outer membrane permeability changes (4, 26).

There are relates of successful treatments using penicillin/  $\beta$ -lactamases inhibitor combinations, mainly piperacillin/tazobactam. They are feasible alternatives for both treatment and prevention of infections caused by ESBL producing strains because they reduce the selective pressure and protect from the appearance and spread of these resistant strains (19, 28, 32, 35).

The studied strains showed high resistance rates to cephalosporins. The overuse of this class of antimicrobials can cause selective pressure what constitute an important risk of appearance of ESBL producing *Enterobacteriaceae* (19, 20, 22, 23, 30, 34, 43). Although cefepime presents a good activity due to the fast outer membrane penetration in gram-negative bacteria, higher affinity to PBPs than other cephalosporins and higher



hydrolysis resistance, in this study cefepime was not very active against the studied strains. Porin mutant *K. pneumoniae* can become more resistant to this drug (36, 37).

Imipenem was the most active drug, because it can easily enter the bacterial cell and it is stable to ESBL hydrolysis (10, 26). However, the use of this antimicrobial must be limited to the treatment directed by susceptibility testing, because there are relatives of *Klebsiella* resistant to carbapenems (12, 27, 41).

Aminoglycosides and fluoroquinolones are also alternative drugs used against infections caused by ESBL producing strains. These drugs showed good activity against non-ESBL *K. pneumoniae* but were not very active against strains producing this mechanism of resistance. The aminoglycosides resistance may occur when the outer membrane permeability is decreased or when there is association of genes codifying ESBL and genes codifying aminoglycosides modifying enzymes in conjugative plasmids (25, 46). Fluoroquinolone resistance, on the other hand, is usually due to alteration in target enzymes (DNA gyrase/ topoisomerase IV) or to impairment access to the target enzymes, occurring because of changes in porin expression (15, 21).

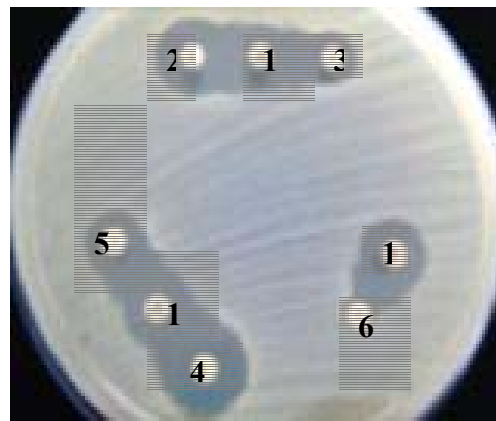
The ESBL producing strains detection has important implications for antibiotic therapy, control and spread of this resistance mechanism. Nevertheless, complementary test to identify the ESBL phenotype many times are not performed in laboratorial daily routine because they lack sensitivity and implicate in additional costs. This way, the prevalence of ESBL producing microorganisms may be underestimated because the routine tests may mislead and require expensive complementary tests (39, 45).

Studies demonstrate that the prevalence rates of ESBL producing microorganisms are higher in Brazil (42%) than in other parts of the world. In this study the prevalence of ESBL strains was not very divergent from the national rate but comparing the

prevalence in the three studied hospitals they were very different. These differences may be due to inadequate clinical material collects, isolation or identification fails. The studied hospitals treat serious patients who are exposed to different risk factors as invasive medical devices, previous extended spectrum antimicrobial use and ICU therapy (32). The power and affinity of each ESBL to the different substrates are variable and makes difficult the ESBL detection (33). In this study, the best antimicrobials for detecting ESBL were cefotaxime and cefpodoxime with 100% activity *in vitro*, similarly to other Brazilian studies (9, 11). These data show that the ESBL detection may vary according to the substrate and the prevalence of the produced ESBL with regional variations (5, 15). Another difficult in detecting ESBL is the low production of this enzyme as TEM-7 and TEM-12. The non detection of the producing isolates may produce incorrect prevalence data (17, 39).

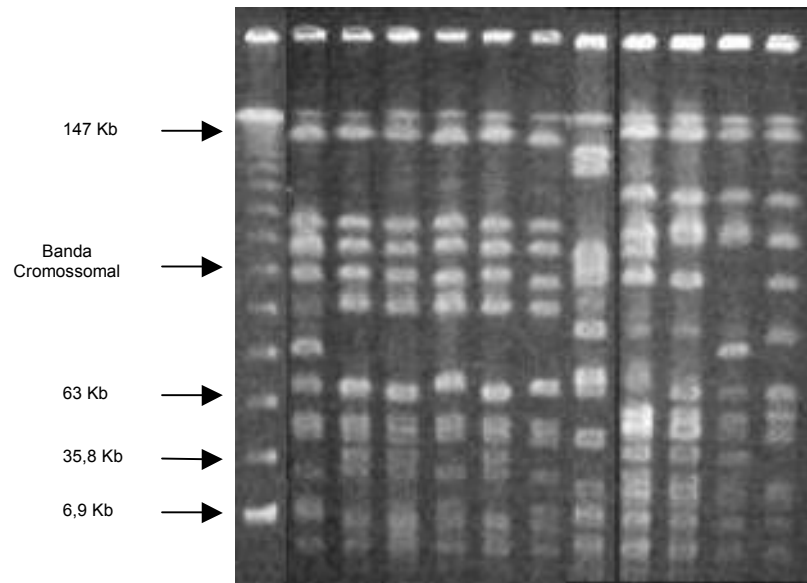
The nature of infections caused by *K. pneumoniae* may be either clonal or multiclonal (27). The multiclonal infections caused by *K. pneumoniae* implicates in the adoption of some actions to modify the antimicrobial use in each hospital and the implement of antimicrobial surveillance programs. The criteria to stablish the rational antimicrobial use must be based in patient clinical features and by the epidemiological profile of the isolated microorganisms. The involved professionals must be aware of the importance of entering into the infection control measures, including the antimicrobial resistant strains surveillance, isolation and barriers to either colonized or infected patients, periodic distribution of data about bacterial susceptibility, educational campaigns, restrict use of broad spectrum antimicrobials, mainly of cephalosporins (ceftazidime), antimicrobial cycling, combined antimicrobial therapy (8, 14, 32, 38, 40, 47). The early detection of ESBL producing strains is essencial for both therapy and control of multidrug resistance spread in communitary and nosocomial outbreaks.

Overall, this study showed it is critical to understanding the importance of developing detection methods and the continuous preventive measures to control infections, mainly the ones caused by multiresistant pathogens.



**Picture 1:** Positive testing to ESBL using Disk approximation test in agar Müller-Hinton (Oxoid®, Inglaterra), (1) amoxicillin/ clavulanate disk, (2) ceftazidime disk, (3) cefotaxime disk, (4) ceftriaxone disk, (5) cefpodoxime disk, (6) aztreonam disk.

λ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



**A A1 A2 A3 A4 A5 B C D E F**  
**Picture 2.** PFGE patterns of the following strains (column – strain number):  $\lambda$  - molecular mass mark, 1-206, 2 -227, 3 - 288, 4 – 314, 5 - 315, 6 - 350, 7 - 365, 8 - 381,9 - 416, 11 - 455, 12 – 567.

**TABLE 1.** *In vitro* susceptibility profile of 61 *Klebsiella pneumoniae* strains collected in two hospitals in Goiânia/Brazil from January 2005 to May 2006

<i>Antimicrobials</i>	<i>Susceptible</i> <i>N (%)</i>	<i>Intermediate</i> <i>N (%)</i>	<i>Resistant</i> <i>N (%)</i>
Ampicillin	2(3,7)	8(14,1)	44(81,5)
Ampicillin/sulbactam	29(53,7)	2(3,7)	23(42,6)
Piperacillin	21(38,9)	3(5,5)	30(55,5)
Piperacillin -tazobactam	36(66,7)	3(5,5)	15(27,8)
Amoxicillin-clavulanate	40(74,1)	10(18,5)	4(7,4)
Ticarcillin-clavulanate	31(57,4)	9(16,7)	13(24,1)
Cefazolin	28(51,8)	1(1,8)	25(46,3)
Cefalotin	26(48,1)	-	28(51,9)
Cefuroxime	33(61,1)	-	21(38,9)
Cefpodoxime	12 (22,2)	-	42(77,8)
Ceftriaxone	34(63,0)	-	20(37,0)
Cefotaxime	28(51,9)	-	26(48,1)
Ceftazidime	33(61,1)	-	22(40,7)
Cefepime	30(55,5)	3(5,5)	22(40,7)
Aztreonam	37(68,5)	-	17(31,5)
Imipenem	54(100)	-	-
Amikacin	38(70,4)	6 (11,1)	10(16,7)
Gentamicin	34 (63,0)	1(1,8)	21(38,9)
Tobramycin	35(64,8)	-	19(35,2)
Levofloxacin	37(68,5)	3(5,5)	14(25,9)
Ciprofloxacin	34 (63,0)	3(5,5)	17(31,5)
Gatifloxacin	33 (61,1)	5(9,3)	16(29,6)
<b>Trimethoprim/sulphamethoxazol</b>	28(51,9)	-	26(48,1)

**TABLE 2.** Result of ESBL producing *K. pneumoniae* phenotype test using Disk Approximation test

Number of ESBL producing <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> (1)	Antimicrobial agents				
	Ceftazidime N (%)	Ceftriaxone N (%)	Cefotaxime N (%)	Cefpodoxime N (%)	Aztreonam N (%)
24 (100%)	19(79,2)	24(100)	24(100)	24(100)	22(91,7)

Legenda: According to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints (2005).

### Acknowledgements

The authors thank Universidade Federal de Goiás and Universidade Católica de Goiás. Santa Casa de Misericórdia Hospital, Araújo Jorge Hospital and Hospital das Clínicas de Goiânia for providing the strains. Thiago L. J. dos Santos for supporting the preparation of the paper.

### References

1. Alp, E.; Güven M.; Yildiz, O.; Aygen, B.; Voss, A.; Doganay, M. (2004). Incidence, risk factors and mortality of nosocomial pneumonia in Intensive Care Units: a prospective study. *Ann Clin. Microbiol. Antimicrobiol.* 3:17-20.
2. Al-Tawfiq, J.A. (2006). Increasing Antibiotic Resistance Among Isolates of *Escherichia coli* Recovered From Inpatients and Outpatients in a Saudi Arabian Hospital. *Infect. Control. Hosp. Epidemiolo.* 27(7):748-53.
3. Asencio, A.; Oliver, A; Gonzáles, DP.; Baquero, F.; Pérez-Díaz, J.C.; Ros, P. (2000). Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin. Infect. Dis.*; 30:55-60.
4. Babic, M.; Hujer, A.M.; Bomono, R.A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on  $\beta$ -lactamases. *Elsevier.* 10:1016-32.
5. Bell, J.M.; Turnidge, J.D.; Gales, AC.; Phaller, M.A.; Jones, RN. (2002). 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). *Diag. Microb. Infect. Dis.* 42:1-7.

6. Bradford, P.A. (2001). Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:933-51.
7. Buisson, C.B.; Philippon, A.; Ansquer, M.; Legrand, P.; Montraveis, F.; Durval, J. (1987). Transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporin during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet.* 342:193-8.
8. Burgess, D. (1999). Princípios farmacodinâmicos dos tratamentos antimicrobianos na prevenção da resistência. *Chest.* 115:19S-23S.
9. Carmo Filho J.R. (2003). Correlação epidemiológica, microbiológica e clínica das infecções hospitalares em Unidades de Terapia Intensiva causadas por *Klebsiella pneumoniae*. São Paulo, Brazil, 145 p. (Thesis. Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina).
10. Edwards, J.J. & Betts, M.J. (2000). Carbapenems: the pinnacle of the  $\beta$ -lactam antibiotics or room for improvement. *J Antimicrob Chemoter;* 45:1-4.
11. Gales, A.C. (1997). Prevalência, sensibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado. São Paulo, Brazil, 122p.(Dissertation. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo).
12. Gales, A.C.; Jones, R.N.; Gordon, K.A.; Sader, H.S.; Wilke, W.W.; Beach, M.L.; Pfaller, M.A.; Doern, G.V. and SENTRY Study Group (Latin America) (2000). Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998). *J. Antimicrob. Chemoter.* 45:295-303.
13. Gniadkowski, M. (2001). Evolution and epidemiology of extended spectrum  $\beta$ -lactamases producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect Dis;* 7:597-608.
14. Goldmann, A.D.; Durbin, W.A. Jr, Freeman, J. (1981) Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit. *J. Infect. Dis.* 144: 449-59.
15. Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. (1991). More extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemoter.* 35:1697-704.
16. Jacoby, G.A.; Chow, N.; Waites, K.B. (2003). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 47:559-62.

17. Katsanis, G.P.; Spargo, J.; Ferraro, M.J.; Sutton, L.; Jacoby, G.A. (1994). Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 32:691-6.
18. Kollef, M.H.; Sherman, G.; Ward, S.; Fraser, V.J. (1999). Inadequate antimicrobial treatment of infections. A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest.* 115:462-74.
19. Lynch, J.P. (2001). Antimicrobial resistance. It's time to reverse the trend. *Chest.* 119:371S-2S.
20. Man, P.; Verhoeven, B.A.N.; Verbrugh, H.A.; Vos, M.C.; Van den Anker, J.N. (2000). An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *Lancet.* 355:973-8.
21. Martínez-Martínez, L.; García, I.; Ballesta, S.; Benedí, V.J.; Hernández-Allé, S.; Pascual, A. (1998). Energy dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1850-2.
22. Meyer, K.S.; Urban, C.; Eagan, J.; Berger, B.J.; Rahal, J.J. (1993). Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection resistant to late generation cephalosporins. *Ann. Inter. Med.* 119:353-8.
23. Murthy, R. (2001). Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest.* 119(2): 405S-11S.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2005) – Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo. Padrão 100 -S15. Wayne PA.
25. Palucha, A.; Mikiewicz, B.; Hryniewicz, W.; Gniadkowski, M. (1999). Concurrent outbreaks of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing organism of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:489-99.
26. Paterson, D.L. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am. J. Infect. Control.* 34:S20-8.
27. Patterson, J.E. (2000).  $\beta$ -lactamases com espectro ampliado (ESBLs): intervenções bem sucedidas, controle e prevenção. 1º Simpósio ESBL: Incidência, importância e soluções. Argentina.
28. Patterson, J.E. (2001) Is there an effect on antimicrobial resistance? *Chest.* 119:426S-30S.



29. Piroth, L.; Auber, H.; Doise, J.M.; Vincet-Martin, M. (1998). Spread of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: are  $\beta$ -lactamase inhibitors of therapeutic value? Clin. Infect. Dis. 27:76-80.
30. Rahal, J.J.; Urban, C.U.; Horn, D.; Freeman, K.; Segal-Maurer, S.; Maurer, J. (1998). Class restriction of cephalosporin use control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. JAMA. 14:1233-7.
31. Rice, L.B. (1999). Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. Pharmacotherapy; 19(8):120S-8S.
32. Rice, L.B. (2001). Evolution and clinical importance of extended spectrum  $\beta$ -lactamase. Chest. 119: 391S-5S.
33. Richards, M.J.; Edwards, J.R.; Culver, D.H.; Gaynes, R.P. (1999). Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. Pediatrics. 103:1-7.
34. Sader, H.S. (2000). Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. Braz. J. Infect. Dis. 4(2): 91-9.
35. Sader, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A., Mendes, R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A. (2001). Pathogen 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):200-14.
36. Sader, H.S.; Jones, R.N.; Andrade, A.; Barocchi, S.; Biedenbach, D.J.; SENTRY Participants (LATIN AMERICA) (2002). Four year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteremia from bloodstream infections in Latin America Medical Centers. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 44 (3) 273-80.
37. Sanders, C.C. & Sanders, W.E. Jr. (1992).  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin. Infect. Dis. 15:824-39.
38. Shlaes, D.M.; Gerding, D.N.; John, J.F.; Craig, W.A.; Bornstein, D.L.; Duncan, R.A. (1997). Society for healthcare epidemiology of America and Infectious Disease Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Infect. Contr. Epid. 18:275-91.
39. Schwaber, M.J.; Raney, P.M.; Rasheed, J.K.; Biddle, J.W.; Willians, P.; MCGowan Jr, J.E. (2004). Utility of NCCLS guidelines for identifying extended spectrum  $\beta$ -lactamase in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. 42(1): 294-8.

40. Strausbaugh, L.J.; Crossley, K.B.; Nurse, B.A.; Thrupp, L.D. (1996). Antimicrobial resistance in longterm care facilities. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 17: 129-40.
41. Sousa Jr, M.A.; Ferreira, E.S.; Conceição, G.C. (2004). Betalactamases de espectro ampliado: um importante mecanismo de resistência bacteriana no laboratório clínico. *Newslab.* 63:152-74.
42. Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9): 2233-9.
43. Tenover, F.C.; Mohamed, M.J.; Gorton, T.S.; Dembek, Z.F. (1999). Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Survey of laboratories in Connecticut. *37:* 4065-70.
44. Thomson, K.S.; Prevan, A.M.; Sanders, C.C. (1996). Novel plasmid mediated  $\beta$ -lactamase in *Enterobacteriaceae*: emerging problems for new betalactam antibiotic. *Current Clin. Infect. Dis.* 16:151-63.
45. Thomson, K.S. (2001). Controversies about extended spectrum  $\beta$ -lactamases and Amp C. *Emerg Infect Dis;* 7 (2).
46. Villa, L.; Pezzella, C.; Tosini, F.; Visca, P.; Petrucca, A.; Carattoli, A. (2000). Multiple antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmid carrying an extended spectrum  $\beta$ -lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob. Agent Chemother.* 44: 2911-4.
47. Yates, R.R. (1999). Novas estratégias de intervenção para redução da resistência aos antibióticos. *Chest.* 115:24S-7S.