

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Surto de infecção hospitalar causado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em uma UTI-neonatal: análise e impacto das medidas de controle.

Emerson Danguy Cavassin

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Elsa Massae Mamizuka

São Paulo
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Surto de infecção hospitalar causado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em uma UTI-neonatal: análise e impacto das medidas de controle.

Emerson Danguy Cavassin

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Elsa Massae Mamizuka

São Paulo
2003

17763

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005749

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C377s Cavassin, Emerson Danguy
Surto de infecção hospitalar causado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em uma UTI-neonatal : análise e impacto das medidas de controle / Emerson Danguy Cavassin.
-- São Paulo, 2003.
142p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Curso de Mestrado Interinstitucional com a Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Mamizuka, Elsa Massae

1. Microbiologia clínica 2. Infecção hospitalar 3. Antibiótico: Farmacologia I. T. II. Mamizuka, Elsa Massae, orientador.

616.0756 CDD

Emerson Danguy Cavassin

Surto de infecção hospitalar causado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em uma UTI-neonatal: análise e impacto das medidas de controle

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elsa Massae Mamizuka
orientador/presidente

Dr. Carlos Emilio Levy

Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo, 01 de setembro de 2003.

A Deus.

**À minha família, meus pais Luiz e Maria
Tereza, meu irmão Marcelo e
ao meu amor, meu amigo,
: meu filho Matheus.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela preciosa oportunidade da vida e do aprendizado.

À Profa. Dra. Elsa, pela orientação, pelo voto de confiança e pela atenção e simpatia com que sempre me atendeu, muito obrigado.

Ao Dr. Levy, pelo direcionamento deste estudo, pelo auxílio e pelas palavras amigas em um momento delicado da minha vida, o meu muito obrigado.

À Profa. Dra. Marilda Vidotto, do Laboratório de Biologia Molecular da UEL, pelo incentivo e generosidade.

À chefia da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do HRNP, por possibilitarem a realização deste estudo naquele ambiente.

Todos os amigos do Laboratório de Microbiologia do HURNP, docentes e técnicos. Em especial à Marsileni, pelas conversas e pela paciência no apoio técnico. À amiga Regina, pela companhia durante os dois anos de MINTER, minha gratidão e admiração.

Aos amigos da CCIH, Márcia, Renata, Claudia, Joseani, Neuza, Nick e Regina, pela colaboração, compreensão e apoio.

Andréa, pelo companheirismo, apoio e carinho.

Aos amigos do MINTER, obrigado pela agradável convivência neste período. Foram dias inesquecíveis, de excelentes aulas, deliciosos churrascos e marrecos... Em especial, à amiga Maria Emilia.

Aos professores-amigos do MINTER. Obrigado é pouco para expressar a gratidão pelo carinho, disponibilidade e atenção que todos tiveram.

Dra. Silvia F. Costa e Priscila Trindade, do Laboratório de Investigação Microbiológica (LIM-54) HC/FMUSP. Pela receptividade e simpatia, senti-me em casa durante o mês que passamos juntos na realização da PFGE.

Aos amigos do LIM-54, pela convivência agradável.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular da UEL, obrigado e boa sorte com os seus estudos.

Fábio e Néia, pelo suporte dado na CCIH. Claudia e Silvia, pela ajuda com a “bicharada”.

Ao pessoal do Serviço de Arquivo Médico do HURNP pela atenção e competência, em especial ao servidor Henrique

Alice e Tereza, pela ajuda e compreensão nos pedidos de última hora.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste estudo.

Às Professoras Edna, Leda e Primavera, por tornarem possível o sonho de dez mestres.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Relação dos neonatos infectados e/ou colonizados por <i>K. pneumoniae</i> ESBL, internados inicialmente na UTI-Neo, em ordem cronológica de internação.....	57
Tabela 01a- Relação dos neonatos infectados e/ou colonizados por <i>K.pneumoniae</i> ESBL, internados inicialmente na UCI, em ordem cronológica de internação.....	59
Tabela 02- Características dos pacientes definidos como casos (infectados e colonizados) e controles.....	71
Tabela 03- Análise do tempo de exposição (dias) a potenciais fatores de risco e a associação a aquisição da cepa epidêmica na forma de colonização ou infecção.....	72
Tabela 03a- Magnitude dos fatores associados estatisticamente significativos e os respectivos intervalos de confiança (95%).....	72
Tabela 04- Análise comparativa entre casos e controles quanto ao uso de diferentes antimicrobianos por períodos maiores ou iguais a 48 horas	73
Tabela 05- Análise comparativa entre casos e controles quanto ao uso combinado de diferentes antimicrobianos por períodos maiores ou iguais a 48 horas.....	73
Tabela 06- Definição da representatividade epidemiológica das cepas tipadas, segundo a relação geográfica e temporal.....	79
Tabela 07- Isolados clínicos de colonização ou infecção selecionados para a análise fenotípica e genotípica (n=73).....	79
Tabela 08- Perfil de sensibilidade da cepa epidêmica e de dois controles obtidos em diferentes situações.....	82
Tabela 8a- Confirmação de ESBL em cinco cepas epidêmicas e dois controles	83
Tabela 09- Perfil de sensibilidade à cefoxitina e aos carbapenêmicos de isolados obtidos do paciente 4.....	84

Tabela 10- Classificação dos diferentes perfis gerados através de análise do polimorfismo do DNA cromossomal.....	90
Tabela 11- Classificação das cepas tipadas pela PFGE segundo o perfil obtido	92
Tabela 12- Comparação da tipagem obtida pelo perfil plasmidial e pela PFGE de 32 cepas de <i>K. pneumoniae</i> ESBL.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Planta baixa do serviço de Neonatologia do HURNP.....	17
Figura 02- Representação dos três períodos definidos para o estudo.....	24
Figura 03- Classificação dos pacientes quanto aos resultados da vigilância microbiológica e epidemiológica.....	25
Figura 04- Detecção de ESBL através da técnica DDS.....	39
Figura 05- Detecção de ESBL através da comparação de discos com e sem clavulanato.....	40
Figura 06- Detecção de ESBL através da tira Etest ^R	41
Figura 07- Incidência de enterobactérias, não fermentadores, cocos Gram-positivo e leveduras isoladas na UN do HURPN, no período de 2000 a 2002.....	51
Figura 08- Prevalência de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> ESBL isoladas de pacientes internados no HURPN, no período de janeiro de 2000 a maio de 2002.....	53
Figura 09- Incidência de <i>E. coli</i> na UN no período de 2000 a 2002 e a frequência de produtoras e não produtoras de ESBL.....	54
Figura 09a- Incidência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> na UN no período de 2000 a 2002 e a frequência de produtoras e não produtoras de ESBL.....	54
Figura 10- Incidência dos pacientes infectados e colonizados no período compreendido entre janeiro de 2000 e dezembro de 2002.....	61
Figura 11- Média das taxas de ocupação da UN durante os anos de 2000, 2001 e 2002.....	62
Figura 12- Densidade de incidência (DI) de pacientes infectados, DI do total de infecções e prevalência mensal de pacientes infectados e colonizados, corrigidos para 100 pacientes-dia/mês, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2002.....	63
Figura 13- Distribuição percentual das infecções pela cepa epidêmica durante o surto.....	64

Figura 14- Isolamento da cepa epidêmica em sítios infectados ou colonizados de pacientes das clínicas UTI-Neo e UCI, no decorrer do período de internação, de junho de 2001 a janeiro de 2002.....	67
Figura 15- Relação entre o número de pacientes com novas infecções e/ou colonizações, a equipe de enfermagem e a taxa de ocupação da UN no período de junho a dezembro de 2001.....	69
Figura 16- Esquema terapêutico adotado para o paciente 4.....	84
Figura 17- Perfil plasmidial de cepas provenientes de infecção e colonização.....	87
Figura 17a- Perfil plasmidial de cepas provenientes de infecção, ambiente, mãos e do HEL.....	87
Figura 18- Perfil plasmidial de cepas isoladas do paciente 15.....	88
Figura 19- Perfil plasmidial de cepas isoladas do paciente 4.....	89
Figura 20 - Dendrograma da porcentagem de relação entre 43 cepas representativas do surto.....	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 01- Medidas de controle instituídas na UN a partir de 27 de agosto de 2001.....	32
Quadro 02- Interpretação do Painel de provas bioquímicas utilizadas pelas placas NUC 3 e NC 20 do sistema automatizado MicroScan ^R	43
Quadro 03- Critérios para interpretação de padrões de bandas gerados por PFGE, segundo Tenover <i>et al</i> (1995).....	48
Quadro 04- Resultado das provas metabólicas realizadas pelo sistema MicroScan ^R	85

ABREVIATURAS E SIGLAS

CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	<i>Centers for Clinical Disease Control</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração inibitória mínima
DDD	Dose definida diária
DI	Densidade de Incidência
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (Ácido desoxiribonucléico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenics Consensus</i>
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i> (beta-lactamase de espectro estendido)
g	Grama
HEL	Hospital Evangélico de Londrina
HURNP	Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná
KDa	Kilo Dalton
MDa	Mega Dalton
mL	Mililitro
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory</i>
NNISS	<i>National Nosocomial Information Surveillance System</i> (Sistema Nacional de Vigilância em Infecção Hospitalar)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (Eletroforese em campo alternado)
rpm	Rotações por minuto
SPCIH	Serviço de Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UN	Unidade neonatal
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTI-neo	Unidade de terapia intensiva neonatal
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	05
2.2 Unidades de Terapia Intensiva	06
2.3 A resistência bacteriana	06
2.3.1 As beta-lactamases de espectro estendido	08
2.4 Infecção hospitalar	09
2.5 Técnicas de tipagem	10
2.6 Detecção e controle de surtos	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Local	16
4.1.1 A unidade de Neonatologia	16
4.2 Considerações	18
4.2.1 A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar	18
4.2.1.1 Vigilância epidemiológica	18
4.2.1.1.1 Vigilância da microbiota da UTI-Neo	19
4.2.1.1.2 Prevalência de produtoras de ESBL no HURNP	20
4.2.1.1.3 Prevalência de <i>E. Coli</i> e <i>K. Pneumoniae</i> na UN	21
4.2.2 Definições	21
4.2.2.1 Taxa de Infecção Hospitalar	21
4.2.2.2 Taxa de pacientes com infecção hospitalar	21
4.2.2.3 Pacientes-dia	21
4.2.2.4 Isolado clínico	22
4.2.2.5 Cepa	22
4.2.2.6 Cepa endêmica, cepa epidêmica	22
4.2.2.7 Medidas de frequência	23

4.2.2.7.1 Prevalência	23
4.2.2.7.2 Incidência	23
4.2.2.7.3 Incidência cumulativa	23
4.2.2.7.4 Densidade de incidência	24
4.3 Períodos do Estudo	24
4.4 Delineamento do Estudo	24
4.5 População do Estudo	26
4.5.1 Quadro de funcionários	26
4.5.2 Pacientes	26
4.5 Variáveis de Exposição e Desfechos	27
4.6 Análise Estatística	30
4.7 Avaliações	30
4.7.1 Medidas de intervenção	30
4.7.2 Avaliação das intervenções	33
4.7.3 Investigação microbiológica	33
4.7.3.1 Controles microbiológicos	33
4.7.3.2 Coleta de materiais	33
4.7.3.2.1 Materiais clínicos	34
4.7.3.2.2 Coletas das equipes de atendimento	34
4.7.3.2.3 Coleta do ambiente	35
4.7.3.3 Cultivo e identificação dos isolados	35
4.7.3.4 Estoque e recuperação das amostras	36
4.7.4 Seleção dos isolados para provas de tipagem	36
4.7.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	37
4.7.6 Detecção fenotípica das ESBL	38
4.7.6.1 Triagem pelo halo e pela concentração inibitória mínima	38
4.7.6.2 Aproximação de discos	38
4.7.6.3 Discos de beta-lactâmicos combinados a inibidores de beta-lactamase	39
4.7.6.4 MicroScan ^R	40
4.7.6.5 Etest ^R	40
4.7.7 Tipagem bacteriana	41
4.7.7.1 Técnicas de fenotipagem	42

4.7.7.1.1 Biotipagem	42
4.7.7.1.2 Antibiotipagem	44
4.7.7.2 Técnicas de genotipagem	44
4.7.7.2.1 Perfil plasmidial	44
4.7.7.2.2 Eletroforese em campo elétrico variável	45
4.8 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Vigilância da microbiota da UN	50
5.1.1 Descrição da microbiota da UN	50
5.2 Prevalência de produtoras de ESBL no HURNP	52
5.3 Incidência de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> na UN	53
5.4 Descrição do surto na UN	55
5.5 A Unidade de Neonatologia	61
5.5.1 Vigilância epidemiológica	62
5.5.2 A distribuição dos casos nos períodos do estudo	65
5.6 População do Estudo	68
5.6.1 Quadro de funcionários	68
5.6.2 Pacientes	69
5.6.2.1 Associação entre procedimentos e infecção ou colonização	71
5.6.2.2 Consumo de antimicrobianos	73
5.7 Medidas de Intervenção	74
5.8 Avaliação de Procedimentos	74
5.9 Investigação Microbiológica	74
5.9.1 Controles microbiológicos	74
5.9.2 Coleta de materiais	75
5.9.2.1 Materiais clínicos	75
5.9.2.2 Coleta das equipes de atendimento	75
5.9.2.3 Coletas do ambiente	77
5.9.3 Cepas selecionadas para a feno e a genotipagem	78
5.9.4 Tese de sensibilidade e detecção de ESBL	81
5.9.4.1 <i>K. pneumoniae</i> com padrão de sensibilidade atípico	83
5.9.5 Tipagem	85
5.9.5.1 Biotipo das cepas epidêmicas	85

5.9.5.2 Antibiotipo das cepas epidêmicas	86
5.9.5.3 Perfil plasmidial das cepas epidêmicas	86
5.9.5.4 Eletroforese em campo elétrico variável (PFGE)	89
5.9.5.5 Relação entre perfil gerados	95
6 DISCUSSÃO	97
7 CONCLUSÕES	125
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
9 APÊNDICE	142
APÊNDICE A- Instrumento utilizado na análise dos prontuários	143
10 ANEXO	144
ANEXO A - A- Comparação entre os pontos de corte usuais para as drogas chave em <i>Enterobacteriaceae</i> e para a detecção de ESBL em <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> e <i>E. coli</i>	145
ANEXO B - Interpretação do teste de confirmação de ESBL com tiras de Etest ESBL ^R	146
ANEXO C - Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HURNP	147
ANEXO D – Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da USP	148

CAVASSIN, Emerson Danguy. Surto de infecção hospitalar causado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em uma UTI-neonatal: análise e impacto das medidas de controle. 2003. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

RESUMO

Introdução: Microrganismos multirresistentes causadores de infecções hospitalares constituem um problema mundial e em ascensão, sendo os recém natos (RN) uma população especialmente exposta.

Objetivo: Estudar a evolução de um surto causado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido em uma UTI-neonatal, bem como avaliar os fatores associados à ocorrência de infecção e o impacto das medidas de controle adotadas.

Métodos: Foi estudada a população de RN (n=1.164) de uma UTI-Neo com taxa média de ocupação de 113% durante 36 meses (janeiro de 2000 a 2002). O surto, com duração de 7 meses, foi analisado através de ampla investigação microbiológica e epidemiológica tipo caso-controle. A relação genética entre as cepas foi estabelecida por eletroforese em campo variado em conjunto com a determinação do perfil plasmidial. As medidas de intervenção basearam-se nas precauções de contato, não sendo alterado o consumo de antimicrobianos.

Resultados: Dos 218 pacientes expostos, 20 foram colonizados e 11 infectados por uma cepa geneticamente relacionada. A investigação microbiológica detectou a contaminação ambiental e das mãos da equipe. O grupo de pacientes infectados e/ou colonizados diferiu dos controles quanto ao uso de nutrição parenteral, transfusão e cateter venoso ($p < 0,05$), embora estes não pudessem ser definidos como fatores de risco. A intervenção resultou no controle do surto e erradicação da cepa epidêmica na unidade.

Conclusão: A análise permitiu definir a natureza monoclonal do agente e sua disseminação, não sendo determinada a existência de um foco exógeno, a adoção de medidas de controle coincidiram com a erradicação da cepa epidêmica.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, Surto, Resistência bacteriana, ESBL

CAVASSIN, Emerson Danguy. Surto de infecção hospitalar causado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em uma UTI-neonatal: análise e impacto das medidas de controle. 2003. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ABSTRACT

Introduction: Multidrug-resistant microorganisms that cause nosocomial infections are a worldwide problem. The increasing incidence of neonatal infections caused by a new type of strain, the ESBL producing *Klebsiella sp* is becoming a major concern to the pediatrician.

Aim: The aim of this study was to analyse an outbreak caused by *Klebsiella sp* in a neonatal intensive care unit (Neo ICU) in order to identify infection or colonisation associated factors of patients with the aid of the Hospital Infection Control Committee.

Methods: A population of 1164 newborns of a Neo-ICU with a mean occupation rate of 113% during 36 months (Jan 2000 to Jan 2002) was studied. The seven-month outbreak was analysed by a microbiological and epidemiological investigation using a case-control design. The typing of *Klebsiella sp* strains was carried out by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and plasmidial profile, in order to establish clonal relationship between the samples. Intervention measures were solely based on contact precautions, the consumption of antimicrobial agents remaining unaltered.

Results: Of the 218 patients exposed, 20 were colonised and 11 were infected by strains belonging to a single lineage. Contamination by *Klebsiella sp* was detected in the environment and in the hands of staff, through microbiological investigation. Patients who were colonised differed from those who showed infection through the use of parenteral nutrition, blood transfusions and central venous catheters ($p < 0.05$), even though these parameters could not be considered as being risk factors. The intervention carried out was successful for the control and eradication of the epidemic strain from the ICU.

Conclusion: Epidemiological analysis was able to identify the monoclonal outbreak of ESBL producing *Klebsiella sp* and characterise its spread pattern in the Neo ICU. An exogenous origin of the outbreak was not established, and the control measures adopted coincided with the eradication of the epidemic strain.

Key words: Nosocomial infection, Outbreak, Bacterial resistance, ESBL.

INTRODUÇÃO

Pertencente à Família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Klebsiella* foi organizado em diferentes sistemas taxonômicos sendo que o mais aceito define suas espécies em: *pneumoniae*, *oxytoca*, *terrigena*, *planticola* e *ornithinolytica*. A espécie *pneumoniae* está subdividida em outras três subespécies: *subsp. pneumoniae*, *subsp. ozaenae* e *subsp. rhinoscleromatis*.

Segundo características morfológicas, são classificados como bacilo Gram-negativo, sendo ainda: imóveis, normalmente encapsulados e com respiração anaeróbia facultativa. Sua presença na natureza segue padrões ubíquos de disseminação que incluem o homem, animais, água, solo e vegetais. Fazem parte da microbiota transitória de alguns sítios anatômicos e são residentes constantes no intestino do homem e de animais, deste modo, também são utilizadas como marcadores sanitários de contaminação fecal, denominados como coliformes totais.

Tanto na comunidade, quanto no ambiente hospitalar, são agentes frequentes em quadros infecciosos e merecem especial atenção. Em meio aos agentes de infecções hospitalares apresentaram importante ascensão nas últimas décadas, inclusive com a descrição de inúmeros surtos na literatura, grande parte acometendo recém nascidos e pacientes pediátricos.

Dentre os ambientes de assistência à saúde, as Unidades de Terapia Intensiva (UTI) constituem um sério problema a ser solucionado no tocante à resistência bacteriana. Na medida em que albergam pacientes em grau extremo de debilidade, manipulação e uso excessivo de antimicrobianos, favorecem elevadas taxas de infecções hospitalares, características estas que se acentuam nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTI-Neo).

A resistência aos antimicrobianos constitui mais um aspecto de difícil manejo nesse contexto. O surgimento e a disseminação de novos mecanismos de resistência limitam as opções terapêuticas, aumentam o consumo de antimicrobianos, o tempo de internação dos

pacientes infectados, os custos da assistência e as taxas de mortalidade. A produção de enzimas que degradam os antimicrobianos vem sendo a principal estratégia de resistência entre os bacilos Gram-negativo, especialmente as beta-lactamases de espectro estendido (*extended-spectrum beta-lactamases*, ESBL).

A compreensão da epidemiologia de cada surto e o uso de técnicas moleculares de tipagem constituem importantes ferramentas. Devem ser considerados todos os possíveis fatores de risco envolvidos e as ações de contenção postas em prática. Deste modo, os surtos em UTI-Neo causados por microrganismos multirresistentes exigem a adoção de medidas ágeis e eficazes de controle e prevenção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

As espécies do gênero *Klebsiella* estão amplamente distribuídas na natureza, na comunidade são saprófitas do trato gastrointestinal (TGI) em 5 a 38% da população e da orofaringe em 1 a 6%; são encontradas raramente na pele, onde permanecem como colonização transitória. Em pacientes hospitalizados a *Klebsiella pneumoniae* é isolada em aproximadamente 77% das amostras intestinais, em 19% das amostras de orofaringe, 13% do trato urinário e em 42% das mãos. Taxa que será tanto maior quanto maior o tempo de internação e uso de antimicrobianos (KONEMAN et al, 2001; PODSCHUM e ULLMANN, 1998).

Ao gênero *Klebsiella* pertencem patógenos oportunistas que causam infecções em humanos nos mais diversos sítios: trato respiratório, urinário, tecidos moles, sistema nervoso central e corrente sanguínea. No ambiente hospitalar, diversos fatores inerentes ao paciente facilitam a colonização e/ou infecção por este agente: 1) tempo prolongado de hospitalização em unidades geriátricas, pediátricas, neonatais, de transplantados oncológicas e em especial nas UTI e também fora do ambiente hospitalar, em instituições geriátricas; 2) presença de doenças de base como diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica, neoplasias e ferimentos cirúrgicos; 3) imunossupressão em suas várias origens; 4) prematuridade e baixo peso ao nascer; 5) uso de procedimentos invasivos, como cateteres vasculares, tubo endotraqueal e dispositivos urinários e 6) uso de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente beta-lactâmicos de espectro ampliado, aminoglicosídeos e quinolonas (SIU et al, 1999; SANDERS e SANDERS, 1997; PODSCHUN e ULLMANN, 1998;).

Segundo dados do *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNISS), em UTI, a frequência no isolamento de *Klebsiella* sp. em infecções da corrente

sangüínea passou de 2,6% no período de 1986 a 1989 para 3,2% na década seguinte, entre 1990 e 1995, o que representou um aumento de 18,7%. A mesma tendência de aumento foi observada nas infecções do trato urinário, passando de 4,8% no primeiro período da observação, para 6,2% na década de 90, totalizando um aumento de 22,6% (FRIDKIN, WELBEL e WEINSTEIN, 1997).

2.2 Unidades de Terapia Intensiva

Os pacientes internados em UTI estão predispostos a infecções invasivas por microrganismos Gram-negativo. Isto se dá pelo rompimento constante de seus mecanismos de defesa, seja pela excessiva debilidade e manipulação, seja pelo uso freqüente de antimicrobianos de largo espectro, levando ao aumento na colonização com patógenos hospitalares (GUPTA, 2002; BERTHELOT et al, 2001; EISEN et al, 1995).

2.3 A Resistência Bacteriana

Neutralizando os benefícios terapêuticos, o fenômeno da resistência bacteriana foi observado desde o início da era antimicrobiana. É um desafio constante para a ciência, que pouco faz para barrar sua evolução. Ao longo dos tempos, os mecanismos de defesa bacteriana (resistência) acompanharam o desenvolvimento de novas drogas, cada vez mais potentes (HARBARTH, 2001; FILE, 1999; MEDEIROS, 1997).

Uma evidência da preocupação crescente sobre resistência é dada pela literatura médica. Em revisão recente, cobrindo 27 anos de publicação da revista *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy, foi observado o aumento no número de artigos nos quais a resistência foi o principal foco, passando de 11% (n= 438) no período de 1972 a 1973, para 34% (n= 1182) no período de 1997 a 1998, sendo que aproximadamente 80% deram ênfase à resistência bacteriana (BURKE, 2001).

Os microrganismos multirresistentes que acometem pacientes hospitalizados podem ser selecionados na microbiota endógena pelo uso intensivo de antimicrobianos, principalmente no TGI, ou transmitidos pelas mãos da equipe hospitalar ou por fômites. Vale ressaltar que um paciente altamente colonizado por um determinado microrganismo apresenta maior possibilidade de adquirir infecção por esse agente, além de participar como reservatório para transmissão horizontal, o que dificulta a erradicação das infecções nosocomiais (HERRUZO-CABRERA et al, 2001; PIROTH et al, 1998; EISEN et al, 1995).

As infecções causadas por microrganismos resistentes acarretam um significativo aumento nos custos quando comparadas às causadas por microrganismos sensíveis (PATERSON et al, 2001; SANDERS e SANDERS, 1992). Estima-se que nos Estados Unidos o gasto anual com os multirresistentes gire em torno de US\$ 100 milhões a US\$ 30 bilhões, considerando ainda que, uma vez gerada, esta resistência será dificilmente revertida (PITOUT, SANDERS e SANDERS, 1997).

Os principais fatores responsáveis pela evolução da resistência podem ser listados: aumento na gravidade das doenças, pacientes imunocomprometidos, novos equipamentos e procedimentos invasivos, uso inadequado de antimicrobianos na comunidade, aumento no uso profilático e terapêutico de antibióticos (PATTERSON et al, 2001), falha nas medidas de higiene no ambiente hospitalar e a mobilidade de elementos genéticos microbianos que codificam os mecanismos de resistência (WEINSTEIN, 2001).

2.3.1 As beta-lactamases de espectro estendido

Os beta-lactâmicos são a droga de escolha em mais de 50% dos esquemas terapêuticos adotados (SANDERS e SANDERS, 1992; LIVERMORE, 1998). Em resposta a este excesso, o mecanismo de resistência de maior impacto clínico entre os Gram-negativo passou a ser a produção de beta-lactamases, enzimas que atuam por ligação covalente com o sítio carbonila do anel beta-lactâmico e inativam a molécula através da hidrólise da sua ligação amida. Tais enzimas participam ainda em ações fisiológicas do metabolismo da parede bacteriana, de modo ainda não determinado.

Historicamente, as beta-lactamases plasmidiais clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 surgiram e foram disseminadas ainda na década de 60, enquanto que as cromossomais AmpC e as plasmidiais de espectro estendido surgiram duas décadas depois. Derivadas das plasmidiais clássicas, pela alteração de poucos aminoácidos, as plasmidiais de espectro estendido passaram a degradar cefalosporinas de primeira à quarta geração, além de monobactam. Entretanto, não atuam sobre cefamicinas e carbapenêmicos e normalmente são bloqueadas por inibidores de beta-lactamases (CHAVES et al, 2001; LIVERMORE, 1998; GAZOULI et al, 1997; SANDERS e SANDERS, 1997; MEDEIROS, 1993).

Muitas vezes o laboratório de microbiologia não está apto a interpretar o mecanismo de resistência envolvido. Em recente estudo europeu, dentre 91 cepas de *Klebsiella* produtoras de ESBL enviadas a diferentes laboratórios para avaliação do perfil de sensibilidade, 64% foram reportadas com resultados inadequados de falsa sensibilidade à cefotaxima (BABINI e LIVERMORE, 2000). Outra avaliação, realizada pelos Centros para Prevenção e Controle de Doenças de Atlanta (*Centers for Diseases Control and Prevention, CDC*) (2000), revelou que

32% (117 de 369) dos laboratórios americanos relataram não utilizar testes para detectar produtores de ESBL em *Enterobacteriaceae*. Tenover et al (1999), enviaram cepas de microrganismos produtores de ESBL SHV-8 e SHV-4 a 38 laboratórios clínicos de Connecticut, onde mais de 90% reportaram inadequadamente estas cepas como sensíveis ou intermediárias a cefotaxima. As limitações na detecção desencadeiam situações tão graves quanto a detecção de surto por produtoras de ESBL TEM-24 evidenciados somente após um ano (MEDEIROS, 1993).

Nos hospitais brasileiros, a prevalência de cepas produtoras de ESBL foi avaliada pelo programa SENTRY, no período entre 1997 e 1999. Foram analisados isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes sítios: em bacteremias, 51,1% eram produtoras de ESBL; em infecções cirúrgicas, 50%; pneumonia, 48,7% e infecção urinária, 43,5% , totalizando uma prevalência de 48,4% na população estudada (SADER et al, 2001).

2.4 Infecção Hospitalar

Por definição, infecção hospitalar é uma reação adversa, local ou sistêmica, que pode se expressar no curso da internação ou no pós-alta, desencadeada pela presença de um agente infeccioso e/ou sua toxina. Deve ser adquirida **após** a internação e relacionada a procedimentos diagnósticos ou terapêuticos, sem evidências de que esteja presente, ou em incubação, no momento da admissão hospitalar (BRASIL, 1998). Os CDC (GARNER et al, 1988) e - no Brasil - a Portaria 2616/98 (BRASIL, 1998), definem os critérios para o diagnóstico das diversas infecções hospitalares.

Como consequência, as infecções hospitalares levam ao aumento da letalidade, tempo de internação e custos. Nos Estados Unidos, as infecções nosocomiais ocorrem em aproximadamente 5% dos pacientes internados e são causa de óbito de pelo menos 88.000 pacientes a cada ano. Em 1992, os gastos estimados com estas infecções foram de US\$ 4,5 bilhões (GRANZOW et al, 1998; GARNER, 1996).

Estudo realizado em janeiro de 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e as Unidades de Controle de Infecção em Serviços de Saúde (UCISA), junto às Coordenadorias Estaduais de Controle de Infecção Hospitalar, revelou que apenas 38,1% dos hospitais brasileiros possuíam uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar instituída, não dispondo de informações precisas quanto aos índices de infecções hospitalares no país (UCISA, 2001).

2.5 Técnicas de Tipagem

A tipagem pode ser baseada em características expressas fenotipicamente e/ou em padrões genotípicos dos microrganismos. O menor custo e a simplicidade operacional da maioria das técnicas fenotípicas possibilitaram a sua disseminação, podendo ser utilizada a antibiotipagem, a biotipagem, fagotipagem, o perfil enzimático e a sorotipagem. Entretanto, muitas vezes estes métodos não apresentam poder discriminatório suficiente para distinguir cepas geneticamente não relacionadas. A aplicação dos métodos fenotípicos tem demonstrado resultados insatisfatórios, pois sua reprodutibilidade e tipabilidade são comprometidas pela instabilidade da expressão gênica. Características fenotípicas de perfil bioquímico e padrão de

sensibilidade podem variar entre isolados de uma mesma linhagem no decorrer de um surto, principalmente em ambiente hospitalar. Mutações aleatórias selecionadas por antibióticos podem afetar uma ou mais vias bioquímicas e a aquisição ou perda de plasmídios de resistência podem alterar o padrão de sensibilidade.

Em condições de surto os sistemas de tipagem e a epidemiologia molecular, associados à análise epidemiológica, possibilitam a melhor compreensão dos acontecimentos e orientam as ações mais adequadas.

2.6 Detecção e Controle de Surtos

A otimização da acurácia dos testes de antibiograma e o desenvolvimento de métodos rápidos de tipagem molecular serão ferramentas valiosas para a determinação do uso correto de antimicrobianos, contenção da resistência e a definição das rotas de transmissão dos microrganismos (HAWKEY, 2001). Numerosos surtos de infecção hospitalar causados por *K. pneumoniae* multirresistente têm sido observados em diferentes países pelo mundo (PALUCHA et al, 1999; SZABÓ et al, 1999), inclusive no Brasil (OTMAN et al, 2002). As medidas de controle incluem basicamente a quebra da cadeia de disseminação com busca de possíveis reservatórios, a aplicação das Precauções Universais (GARNER, 1996) e a otimização do uso de antimicrobianos.

Devido à codificação das ESBL ser plasmidial, durante o processo de investigação de um surto deve ser considerada a possibilidade de transmissão cruzada de plasmídios. São descritos surtos onde o mecanismo de disseminação da resistência deu-se via

plasmídios e não pela disseminação de uma cepa específica. Tal informação deve ser conhecida ao se planejar as medidas de controle (WIENER *et al*, 1999).

Deste modo, a prevenção e o controle das infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae* produtora de ESBL (*K. pneumoniae* ESBL) deve ter caráter emergencial, sobretudo em condições de surto e em pacientes debilitados, como os internados em uma UTI-Neo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar um surto causado por *K. pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido em uma UTI-Neonatal e a sua erradicação, avaliar os fatores de risco e o impacto das medidas de controle adotadas.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever um surto em uma população específica de recém nascidos.
- Realizar uma investigação microbiológica para desvendar as possíveis fontes da cepa epidêmica incluindo pacientes, funcionários, materiais e ambiente.
- Conhecer a relação genética entre as cepas isoladas durante o surto através de técnicas de genotipagem.
- Determinar as rotas de disseminação da cepa epidêmica pela Unidade Neonatal
- Determinar a associação entre a exposição a alguns procedimentos e o desenvolvimento de colonização e infecção pela cepa epidêmica.
- Observar o impacto das medidas de intervenção na evolução do surto.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

O presente estudo foi realizado no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP), um hospital escola público ligado à Universidade Estadual de Londrina (UEL), de referência terciária, que presta atendimento universal à população em diversas especialidades médicas. Por se tratar de um centro de referência regional, o hospital atende a pacientes do norte do Paraná e de estados vizinhos. Com uma média de 18.000 atendimentos mensais, incluindo ambulatorios, suas unidades de internação contam com 294 leitos distribuídos entre pronto-socorro, enfermarias e três unidades de terapia intensiva (UTI): UTI de adultos, com 17 leitos; UTI pediátrica, com 05 leitos e Unidade Neonatal (UN) com 19 leitos. Todos os atendimentos são exclusivos ao Sistema Único de Saúde (SUS).

4.1.1 A unidade de Neonatologia

A Unidade Neonatal (UN) do HURNP atende a uma elevada demanda de pacientes, alguns deles, prematuros de alto risco. A unidade está subdividida em duas alas, estruturadas segundo a complexidade do suporte prestado: a Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI-Neo) e a Unidade de Cuidados Intensivos (UCI).

Durante o período de internação os pacientes são transferidos entre as alas segundo a sua evolução clínica. Permanecem na UTI-Neo aqueles que necessitam de suporte avançado, passando à UCI na medida em que o quadro clínico se mostra estável. Esta característica de mobilidade de pacientes entre as alas dificultou o estudo dos fatores relacionados a cada um dos ambientes. Deste modo, as análises realizadas referem-se de modo conjunto à Unidade Neonatal (UN), englobando os pacientes internados na UTI-Neo e UCI.

Totalizando 19 leitos (07 da UTI-Neo e 12 da UCI), a média mensal de internações da UN de janeiro de 2000 a dezembro de 2002, foi de 34 ($\pm 7,6$)^{*} pacientes, com aproximadamente 596 ($\pm 84,3$) pacientes-dia/mês e uma média de permanência de 16,8 ($\pm 2,5$) dias, totalizando uma taxa de ocupação de 113% ($\pm 19,7$) no período (Serviço de Arquivo Médico, HURNP).

A Figura 1 ilustra a planta baixa da unidade e a disposição dos leitos e pias. Havendo apenas uma pia em cada ambiente, nelas realizam-se os diferentes procedimentos da assistência, como a higienização das mãos, o banho dos RN e o preparo das medicações.

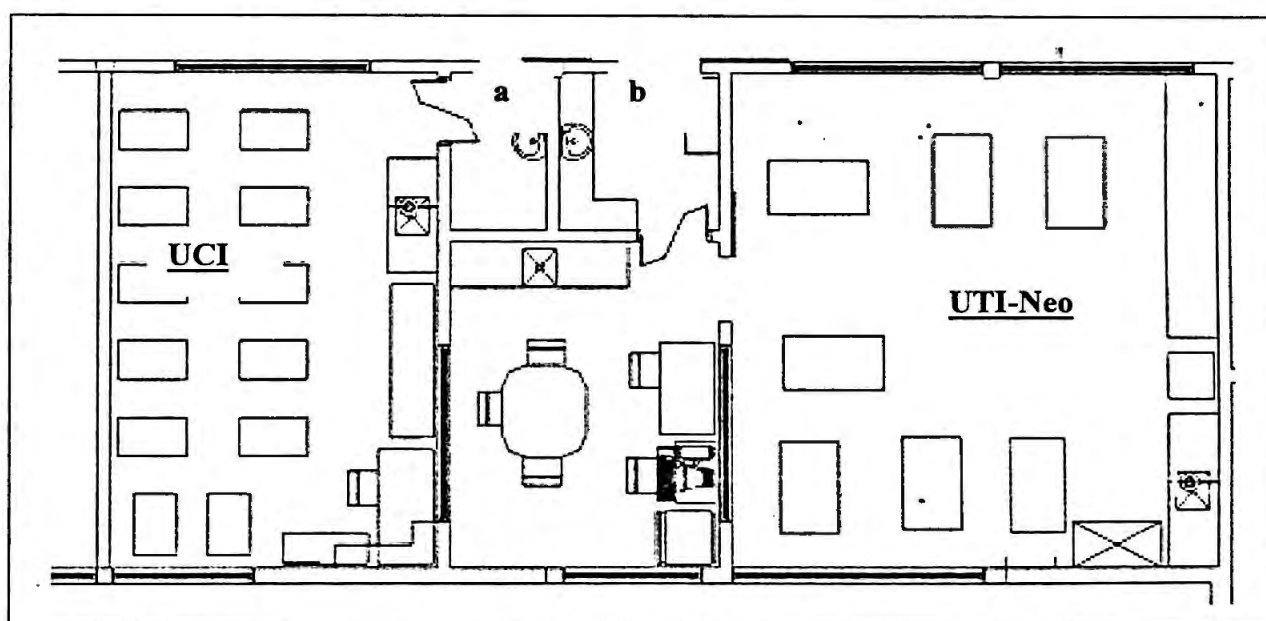


Figura 1- Planta baixa do serviço de Neonatologia do HURNP. Estão representadas as unidades de UCI (12 leitos) e UTI-Neo (7 leitos), além dos postos de enfermagem, área de prescrição e a disposição das pias

a: entrada para a UCI; b: entrada para a UTI-Neo

Fonte: Departamento de Engenharia e Arquitetura, HURNP, Londrina, Brasil

* Desvio padrão

4.2 Considerações

4.2.1 A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

Atendendo às determinações da Portaria 2616/1998 (BRASIL, 1998), o HURNP possui, oficialmente instituída, uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) de caráter multidisciplinar. Todos os serviços atuantes no Hospital são representados por membros denominados como consultores, incluindo: serviço médico, de enfermagem, de farmácia, de manutenção, laboratório de microbiologia e administração.

Os membros executores da CCIH constituem o Serviço de Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar (SPCIH) e, portanto, são encarregados de executar as ações planejadas que objetivam a prevenção e o controle das infecções hospitalares. Este Serviço é composto por dois médicos infectologistas, uma enfermeira, dois auxiliares de enfermagem, dois microbiologistas, um farmacêutico hospitalar e um auxiliar administrativo, além de 25 estagiários dos cursos de Medicina, Enfermagem e Farmácia Bioquímica.

4.2.1.1 Vigilância epidemiológica

A vigilância epidemiológica realizada pelo SPCIH permitiu avaliar a frequência e a distribuição das infecções hospitalares, bem como seus fatores de risco e agentes etiológicos. Os resultados obtidos possibilitam o planejamento estratégico das ações de prevenção e controle mais adequadas.

O SPCIH avaliou a epidemiologia das infecções hospitalares através de vigilância ativa, com a participação de duas auxiliares de enfermagem e supervisão direta da enfermeira e dos médicos do SPCIH. A classificação das infecções foi realizada de acordo

com as determinações do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria 2616/98 (BRASIL, 1998).

Até março de 2003 o Laboratório de Microbiologia do SPCIH adotou como rotina a realização de culturas de vigilância da microbiota colonizadora dos pacientes internados em todas as UTI. Culturas semanais de secreção traqueal eram colhidas dos pacientes internados por mais tempo e/ou mais manipulados. Todos os microrganismos recuperados passavam para a identificação de gênero e espécie, inclusive com os respectivos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Atualmente, a vigilância da microbiota colonizante está restrita às investigações de surto, de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina e, quando indicado, de material nasal para pesquisa de portadores de *Staphylococcus aureus*.

Em agosto de 2001, verificou-se o aumento nos casos de infecções causadas por *K. pneumoniae* multirresistente produtora de ESBL (*K. pneumoniae* ESBL) na UN. Em um mês, foram diagnosticados três novos pacientes infectados, totalizando oito infecções: três infecções da corrente sanguínea, três infecções urinárias e duas infecções do acesso vascular. A busca retrospectiva revelou ainda a presença de isolados com mesmo biótipo e antibiograma nos meses de junho e julho do mesmo ano. Estes achados fizeram com que a CCIH estabelecesse estratégias objetivando o controle da situação, já definida como surto.

4.2.1.1.1 Vigilância da microbiota da UN

Foram tabulados os resultados de todas as culturas coletadas na UN durante os anos de 2000, 2001 e 2002, e observada a tendência de isolamento de todos os microrganismos obtidos. Para cada agente foi considerado apenas o primeiro isolado e

excluídas as duplicatas, tanto de sítios infecciosos quanto colonizados. As informações foram obtidas no banco de dados do Laboratório Clínico do HURNP.

4.2.1.1.2 Prevalência de produtoras de ESBL no HURNP

Como forma de contextualizar os resultados de produtoras de ESBL na UN em relação ao o hospital como um todo, foram avaliadas todas as culturas realizadas pelo Laboratório de Microbiologia nas outras unidades do HURNP, no período de janeiro de 2000 a maio de 2002. Foi considerado apenas o primeiro isolado de *K. pneumoniae* e *E. coli* de cada paciente, perfazendo um total de 3.554 isolados clínicos. As cepas isoladas foram identificadas segundo o sistema automatizado MicroScan WalkAway® (Dade Behring, Sacramento, EUA). A confirmação fenotípica de ESBL foi realizada por sinergismo de duplo disco, microdiluição com o sistema MicroScan® (placas NegCombo 20) e, nos casos duvidosos, Etest® ESBL (ceftazidima/ceftazidima-ácido clavulânico; AB Biodisk, Solna, Suécia). A metodologia utilizada não sofreu alterações durante todo o período do estudo e seguiu as determinações preconizadas pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (2000, 2001 e 2002).

A única alteração neste período, mais precisamente em julho de 2000, foi o rodízio de antimicrobianos no formulário médico da instituição, resultando na supressão da ceftazidima, que foi substituída por piperacilina-tazobactam, cefepime, ou outra classe, de acordo com os resultados do antibiograma.

4.2.1.1.3 Prevalência de *E. coli* e *K. pneumoniae* na UN

Foi avaliada na UN a prevalência dos gêneros bacterianos definidos como principais produtores de enzimas ESBL, a *E. coli* e *K. pneumoniae*. Foram tabulados todos os isolados clínicos obtidos no período de 2000 a 2002 e definida a frequência de produtoras de ESBL.

4.2.2 Definições

4.2.2.1 Taxa de infecção hospitalar

Calculada pela razão entre o número de episódios infecciosos classificados como nosocomiais e o número de entradas (admissão) ou saídas (altas, óbitos, transferências) dos pacientes (BRASIL, 1998).

4.2.2.2 Taxa de pacientes com infecção hospitalar

Calculada tomando como numerador o número de doentes que apresentaram infecção hospitalar no período considerado e como denominador o total de entradas ou saídas no período (BRASIL, 1988).

4.2.2.3 Pacientes-dia

O número de pacientes-dia é obtido somando-se os dias totais de permanência de todos os pacientes no período considerado. Recomenda-se que os indicadores

epidemiológicos sejam calculados utilizando-se no denominador o total de paciente-dia no período (BRASIL, 1998), dessa forma define-se a densidade do numerador.

4.2.2.4 Isolado clínico

O termo “isolado” foi utilizado como definição genérica de cultura pura, originada de uma única colônia proveniente de um isolamento primário, sendo conhecidos apenas o gênero e a espécie (TENOVER et al, 1995).

4.2.2.5 Cepa

Um isolado clínico, ou grupo de isolados, que pode ser distinguido de outros isolados do mesmo gênero e espécie por características fenotípicas e/ou genotípicas. Pode ser vista como uma subdivisão descritiva da espécie (TENOVER et al, 1995). Neste estudo o termo “linhagem” foi tomado com sinônimo de cepa.

4.2.2.6 Cepa endêmica, cepa epidêmica

Termos que descrevem a frequência com a qual as cepas são isoladas em um dado momento e local. O termo “endêmico” denota proximidade às tendências usuais de isolamento, enquanto que a definição “epidêmica” ilustra aumento na frequência, acima do usual e livre de influências sazonais.

Neste estudo, os isolados clínicos de *K. pneumoniae* endêmicos e epidêmicos foram agrupados em diferentes cepas definidas segundo seus perfis de macrorrestrição do DNA cromossômico, evidenciados pelo PFGE.

4.2.2.7 Medidas de frequência

Foram utilizadas as seguintes medidas de frequência: incidência, incidência cumulativa, densidade de incidência e prevalência (GORDIS, 2001).

O termo “frequência” foi utilizado para quantificar determinado evento de maneira genérica, sem relação com a definição de caso novo ou antigo, população exposta ou unidade de tempo.

4.2.2.7.1 Prevalência

Parte da população analisada que apresenta o evento em estudo, totalizando o número de casos existentes: antigos e novos. Pode ser uma medida instantânea, observada em um único momento, ou de um período.

4.2.2.7.2 Incidência

São considerados os indivíduos que não tinham a expressão do evento observado por ocasião do início do estudo e passam a expressá-lo. Portanto, são os casos novos ocorridos na população estudada.

4.2.2.7.3 Incidência cumulativa

É a relação entre a incidência e o total da população exposta. Denota o risco de um indivíduo apresentar o evento observado durante o período do estudo.

4.2.2.7.4 Densidade de incidência

É uma forma de corrigir a incidência cumulativa, levando em consideração não apenas o número de indivíduos expostos, mas também o tempo no qual esta exposição ocorreu. Desse modo, o denominador utilizado deve ser o número de pacientes-dia no período observado.

4.3. Períodos do Estudo

O estudo foi realizado com os pacientes internados entre 01 de janeiro de 2000 e 31 de dezembro de 2002. Neste intervalo, o período compreendido até 31 de maio de 2001 foi definido como “período pré-surto”; entre 01 de junho de 2001 e 31 de janeiro de 2002, “período de surto” e após 01 de fevereiro de 2002, como “período pós-surto” (Figura 2).

2000					2001					2002													
J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Pré-surto										Surto					Pós-surto								

Figura 2- Representação dos três períodos definidos para o estudo
 *As letras representam os meses do ano, de janeiro a dezembro

4.4 Delineamento do Estudo

Com o objetivo de se definir os fatores associados à infecção e colonização pela cepa epidêmica, optou-se por um modelo do tipo caso-controle. A Figura 3 ilustra a distribuição dos pacientes segundo os resultados da vigilância microbiológica e

epidemiológica. Os dados selecionados para a análise foram coletados através dos prontuários médicos com a utilização de um instrumento padronizado (APÊNDICE A).

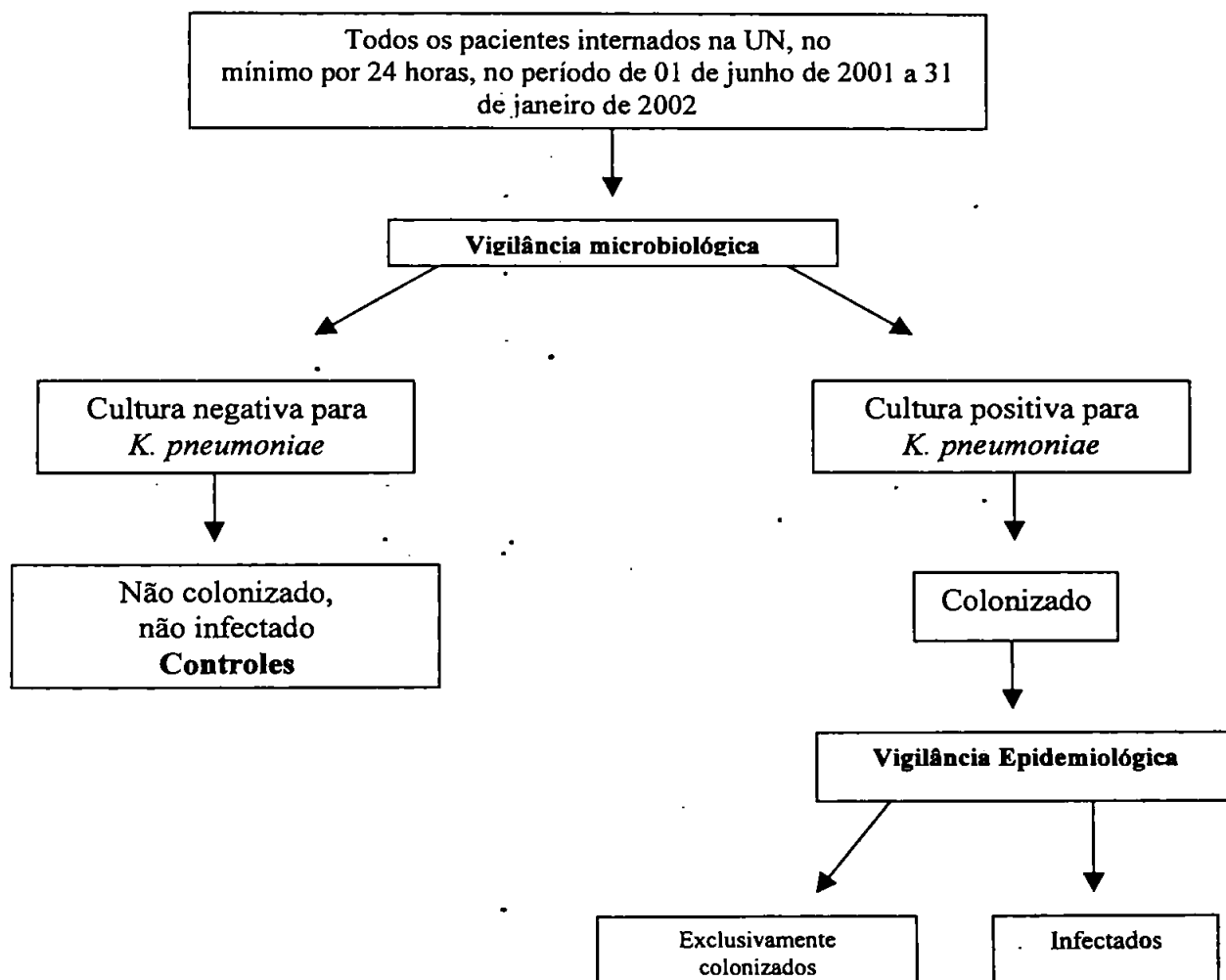


Figura 03- Classificação dos pacientes quanto aos resultados da vigilância microbiológica e epidemiológica

4.5 População do Estudo

4.5.1 Quadro de funcionários

No período do surto, a unidade contava com uma equipe de nove médicos, incluindo plantonistas e docentes, uma fisioterapeuta e um corpo de enfermagem composto por quatro enfermeiras e 38 auxiliares de enfermagem. Foi calculada a relação entre os números da equipe de enfermagem, ocupação do setor, de infecções e de pacientes infectados/colonizados no período do surto.

Os funcionários relacionados ao setor, como auxiliares de enfermagem, enfermeiras, fisioterapeutas, internos, residentes, docentes e plantonistas foram informados da ocorrência do surto, da necessidade de investigação e sobre as medidas de prevenção e controle.

4.5.2 Pacientes

Foram incluídos no estudo todos os pacientes internados por mais de 24 horas no período de 01 de junho de 2001 a 31 de janeiro de 2002 na UN do HURNP, totalizando 230 recém natos classificados segundo a investigação microbiológica e epidemiológica instituídas.

Para a avaliação histórica das taxas e tendências das infecções hospitalares causadas pela *K. pneumoniae* ESBL, foi traçada a curva de incidência e da densidade de incidência (por 100 pacientes-dia/mês) de isolamento de *K. pneumoniae* durante os três anos do estudo, sendo computadas 1.232 entradas.

Para a análise da associação com colonização e infecção os pacientes que tiveram cultura positiva foram definidos como casos e os internados no mesmo período, com culturas negativas para a cepa epidêmica, foram classificados como controle. Foram assim definidos 52 controles para os 31 casos registrados.

Para o estudo de caso-controle desenvolvido, os 31 casos (11 infecções e 20 colonizações exclusivas) foram pareados com 52 controles internados no mesmo período, sendo comparados os seguintes grupos: infectados x exclusivamente colonizados, infectados x controles, exclusivamente colonizados x controle e casos (infectados mais colonizados) x controle. Os prontuários dos pacientes foram separados pelo Serviço de Arquivo Médico, sendo selecionados de maneira aleatória os que apresentaram culturas negativas para *K. pneumoniae*.

Apenas o primeiro isolado de cada paciente foi considerado, tanto para os casos de infecção quanto para os casos de colonização (casos incidentes). Alguns pacientes apresentaram infecções e colonização em diferentes sítios, enquanto outros desenvolveram quadros infecciosos causados pela cepa epidêmica sem a documentação microbiológica de colonização, ainda assim, estes foram computados também como colonizados.

4.5 Variáveis de Exposição e Desfechos

Os casos de infecção foram definidos através dos exames complementares, evolução clínica, avaliação médica e uso de antimicrobianos, conforme os critérios estabelecidos pelo CDC para diagnóstico das infecções hospitalares (GARNER, 1988). Os pacientes com cultura positiva para *K. pneumoniae* ESBL que não puderam ser enquadrados nos critérios de infecção foram definidos como colonizados.

Na análise dos fatores associados com colonização e infecção foram eleitas as seguintes variáveis de exposição, com os respectivos desfechos:

- Sexo: investigada a existência de relação significativa entre colonização e infecção conforme o sexo.
- Idade gestacional: tempo de vida ao nascer, estimado a partir do último período menstrual normal, calculado em semanas e dias. São considerados recém nascidos a termo aqueles com 37 a 42 semanas completas (CENTRO BRASILEIRO DE CLASSIFICAÇÃO DE DOENÇAS, 1993). O nascimento pré-termo de alto risco foi considerado como inferior a 28 semanas.
- Peso ao nascer: primeira tomada de peso do RN, medida em gramas. Definido o peso extremamente baixo ao nascer como marcador de gravidade. A análise foi estratificada para pacientes com ≤ 1000 g e ≤ 1500 g (HUDOME e FISHER, 2001).
- Boletim de Apgar (primeiro e quinto minuto): consiste na avaliação de parâmetros cardio-respiratórios e neurológicos, realizada ainda na sala de parto. Feita em dois momentos, no primeiro minuto reflete as condições do nascimento e a evolução após cinco minutos denota a integridade dos parâmetros observados. O valor de Apgar inferior a sete no quinto minuto denota gravidade.
- Tempo de estada na UN: para o grupo de casos foi considerado o intervalo entre a admissão na UN e o primeiro isolamento de *K. pneumoniae* ESBL, enquanto que para o grupo de controles a medida de tempo utilizada foi a permanência do RN na UN, até a sua transferência ou alta hospitalar. No modelo tempo-dependente, os controles foram acompanhados até o 16^o dia de internação.
- Doença congênita ou associada: a presença de doenças congênitas ou associadas foi registrada durante a revisão de prontuários.

- Uso de nutrição parenteral/enteral: definido como o uso de nutrição por via parenteral ou enteral durante o período de observação de casos e controles.
- Uso prévio de antimicrobianos: uso de antimicrobianos por pelo menos 24 horas, seja empírico, profilático ou terapêutico. Avaliado o uso de penicilina, ampicilina, cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona), de quarta geração (cefepima), monobactam (aztreonam), carbapenêmicos (imipenem e meropenem), quinolonas e aminoglicosídeos (gentamicina e ampicacina).
- Uso de CPAP nasal: uso de dispositivo de auxílio à ventilação.
- Terapia imunossupressora: uso terapêutico de corticosteróides.
- Uso de hemoterapia: transfusão de hemocomponentes ou diálise.
- Intubação: passagem de tubo para ventilação mecânica.
- Cirurgia prévia: ocorrência de procedimento cirúrgico de qualquer natureza.
- Uso de cateter urinário
- Uso de cateter vascular.
- Uso de outros procedimentos invasivos: definido com uso de sondas e drenos
- Origem: local do parto, se no HURNP ou em outra instituição obstétrica.

Casos e controles tiveram os procedimentos analisados como variáveis contínuas, em número de dias de exposição, e também foram categorizados, como expostos ou não expostos. Os fatores associados foram computados para os casos de duas formas: na primeira, somente até a primeira ocorrência do evento estudado (o isolamento da cepa epidêmica em sítio colonizado ou infectado) e na segunda, durante toda a internação. Os controles tiveram seus procedimentos observados segundo um modelo proporcional tempo dependente, sendo avaliados até o 16º dia de internação e também até a alta hospitalar.

4.6 Análise Estatística

Foi utilizada estatística descritiva através das médias e desvios padrão, com intervalos de confiança de 95% para as proporções. Para a análise da associação entre as variáveis dicotômicas dos fatores associados, foi utilizado o Teste do Qui-quadrado ou o teste Exato de Fisher. A magnitude das associações estatisticamente significativas foi calculada através da razão de chances e os respectivos intervalos de confiança de 95%. Para variáveis contínuas com distribuição normal foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes, enquanto que para as variáveis sem distribuição normal foi utilizado o teste de Wilcoxon (Wilcoxon Rank Sum Test). O nível de significância foi estipulado como $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Arcus (Arcus QuickStat; Longman Software Publishing, 2000)

4.7 Avaliações

4.7.1 Medidas de intervenção

Caracterizado o surto, em 27 de agosto de 2001, as estratégias para as ações de controle foram planejadas pelos membros executores do SPCIH, em conjunto com as equipes da UN.

Objetivando a redução na incidência de *K. pneumoniae* ESBL, iniciou-se um processo de avaliação de procedimentos, educação continuada e treinamento através de reuniões com toda a equipe da unidade. Foram enfatizadas: a importância da correta higienização das mãos com sabão anti-séptico, o uso associado de álcool gel 70%, o uso de luvas e avental, a desinfecção concorrente e terminal do ambiente e de equipamentos e a

técnica de coorte e isolamento de contato, preconizadas pelo CDC (HOSPITAL INFECTION CONTROL ADVISORY COMMITTEE, 1996).

Os pacientes colonizados e ou infectados tiveram seu leito identificado por placas descritivas alertando para o isolamento e os cuidados necessários antes durante e após o contato. O uso de gorro, propé e máscara não foram definidos como medida de impacto para o controle do surto.

Foram intensificadas as culturas de vigilância, inclusive com três observações de prevalência pontual, quando se colheram amostras de secreção traqueal de todos os RN internados.

Em reunião com o Secretário de Saúde do Município de Londrina, foi definido o fechamento da UN pelo período de uma semana, de 20 a 27 de setembro de 2001, sendo reaberta gradativamente após a redução das taxas de ocupação.

Os pacientes saíram da UN somente após a alta hospitalar, não sendo transferidos para outros setores, salvo poucas exceções. Quando necessário, a unidade de destino dos pacientes transferidos foi informada quanto aos cuidados de isolamento a serem seguidos.

No período do surto o formulário de antimicrobianos foi mantido, sem medidas de substituição quanto ao consumo de quaisquer classes, apenas sendo reforçada junto à equipe médica da instituição a importância do seu uso racional. O Quadro 1 lista as medidas de intervenção adotadas.

Quadro 01- Medidas de controle instituídas na UN a partir de 27 de agosto de 2001

Admissão e alta hospitalar	Após a definição da condição de surto, tentou-se estabelecer coortes de isolamento (preferencialmente no ambiente da UCI), as novas internações ocorreram na UTI-Neo. Em alguns momentos, o número de leitos disponíveis impossibilitou a adequada aplicação desta medida. Sempre que possível, os pacientes tiveram alta da UN para a comunidade.
Visitas	O número de visitantes foi restrito. Com exceção da mãe, foi desencorajado o contato direto com os pacientes. Todos foram orientados sobre os cuidados de isolamento, o uso de luvas e de avental.
Transferência entre setores	Evitou-se a transferência de RN para outros setores. Sempre que necessário, o Serviço de Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar foi notificado. Foram repassadas todas as orientações ao setor de destino.
Culturas de vigilância	Periodicamente, todos os pacientes foram avaliados quanto a colonização por <i>K. pneumoniae</i> em trato respiratório e fossas nasais.
Estado de saúde dos funcionários	Todos os funcionários foram informados quanto aos riscos do contato com a cepa epidêmica, sendo orientados a procurar um representante da CCIH em casos de dúvida.
Assistência ao paciente	No período do surto, todo atendimento ao paciente foi realizado com o uso de luvas e avental, seguido da higienização das mãos.
Higienização das mãos	As equipes foram orientadas para a higienização e desinfecção das mãos, antes e após cada contato com os pacientes, com triclosan ou clorhexidine
Exames complementares	Os funcionários do Laboratório Clínico e da Radiologia foram orientadas para cumprimento dos cuidados de isolamento.
Equipe	A equipe de cada unidade (UTI-Neo e UCI) foi individualizada, ficando proibido o atendimento aos pacientes da unidade vizinha.
Desinfecção do ambiente	No período do surto foi orientada a desinfecção concorrente e terminal de todas as incubadoras e berços com Incidin ^R (associação de aldeídos)
Limpeza da unidade	Foram reforçadas as orientações à equipe de zeladoria quanto a limpeza. Em duas ocasiões, durante o surto, as unidades foram desocupadas e lavadas utilizando-se água e sabão.

4.7.2 Avaliação das intervenções

Os procedimentos médicos, de fisioterapia, de enfermagem e de zeladoria foram revistos e avaliados quanto a possíveis quebras de técnica.

A adequação com a política de uso de antimicrobianos continuou a ser avaliada pelo médico responsável, ligado à CCIH.

Embora tenham sido controladas, não foram instituídas auditorias sistematizadas para quantificar a adesão às medidas de intervenção estabelecidas.

4.7.3 Investigação Microbiológica

4.7.3.1 Controles microbiológicos

O Laboratório de Microbiologia do SCPIH do HURNP mantém a rotina de avaliação da qualidade microbiológica de diversos produtos utilizados na assistência ao paciente, dentre eles: água potável e de hemodiálise, hemoderivados, nutrição enteral e parenteral, leite materno e, quando necessário, álcool 70°, detergentes e degermantes, entre outros materiais.

4.7.3.2 Coleta de materiais

Diferentes materiais foram cultivados no processo de investigação do surto, incluindo amostras de pacientes, funcionários, ambiente e materiais de consumo.

No Laboratório de Microbiologia o conteúdo dos sacos plásticos foi transferido para tubos secos estéreis, incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 16 a 18 horas e repicados em agar McConkey (Merck, Alemanha).

4.7.3.2.3 Coleta do ambiente

No ambiente da UN foram colhidas amostras de equipamentos, superfície de bombas de infusão, portas de incubadoras e pias (n= 25), além de fômites como pranchetas e estetoscópios (n= 4). As coletas foram realizadas através de hastes com algodão estéril umedecido em caldo TSB. Deu-se prioridade às superfícies mais freqüentemente tocadas com as mãos.

No período do surto foram ainda colhidas amostras de medicamentos de uso tópico e de frascos abertos em uso pelo setor.

4.7.3.3 Cultivo e identificação dos isolados

Após coleta e incubação inicial por 16 a 18 horas em caldo TSB, sob temperatura de $36 \pm 1^\circ \text{C}$ e atmosfera ambiente, as amostras foram repicadas em agar Müeller Hinton (Oxoid, Inglaterra) com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin, Brasil), MacConkey e manitol salgado (Merck, Alemanha). Incubadas nas mesmas condições por mais uma noite, foi realizada a identificação dos isolados clínicos obtidos, sendo inicialmente avaliadas as características macroscópicas, morfo-tintoriais e bioquímicas compatíveis com *K. pneumoniae*, segundo técnica de referência (FARMER, 1999).

Com o objetivo de se recuperar todas as *K. pneumoniae* presentes nos materiais colhidos, não foram utilizados meios suplementados com antimicrobianos. Desta

forma, buscou-se manter o rigor na caracterização das colônias crescidas, realizando os testes de identificação e antibiograma para todas as colônias características de *K. pneumoniae* que apresentaram variações de tamanho, forma, brilho, cor ou textura.

4.7.3.4 Estoque e recuperação das amostras

O estoque das cepas partiu de colônias puras crescidas em Agar McConkey, e foi realizado em agar nutriente, mantido a temperatura ambiente, e em TSB com 30% de glicerol, sob refrigeração de -70°C .

A recuperação das amostras se deu pela ativação em caldo TSB por 24 horas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em atmosfera ambiente, seguida de repique em agar tripton caseína de soja (TSA; Merck, Alemanha) e nova incubação sob as mesmas condições. As análises subseqüentes partiram sempre de colônias isoladas, crescidas em cultura pura.

4.7.4 Seleção dos isolados para provas de tipagem

Foram colhidas 341 culturas durante o processo de investigação e vigilância. Entre as culturas com *K. pneumoniae* foram escolhidos, de maneira aleatória, isolados representativos dos funcionários, ambiente e pacientes. Além de controles epidemiologicamente relacionados e não relacionados.

As cepas isoladas de uma mesma fonte, obtidas em coletas consecutivas, com intervalo menor que três dias e com similaridade de biotipo e antibiotipo foram consideradas duplicatas e computadas apenas no primeiro evento.

Os outros setores do HURNP incluíram as enfermarias de adultos ($n= 06$), pediatria ($n= 03$) e UTI adulto ($n= 01$), colhidas no período de julho de 2001 a agosto de 2002.

Foram incluídas ainda cepas obtidas da Unidade Neonatal do Hospital Evangélico de Londrina, um hospital terciário de médio porte que, segundo informação da sua CCIH, documentou um surto por *K. pneumoniae* ESBL contemporâneo ao do HURNP. Alguns isolados foram encaminhados ao laboratório de microbiologia do Serviço de Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar do HURNP e incluídos para tipagem neste estudo.

4.7.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método qualitativo de disco difusão de Kirby e Bauer e por métodos quantitativos: Etest^R (AB Biodisc, Solna, Suécia) e microdiluição pelo sistema automatizado MicroScan^R (Dade Behring, Sacramento, Califórnia) utilizando as placas *Neg Urina Combo 3* (NUC 3) e *Neg Combo 20* (NC 20).

Foram seguidas as recomendações do NCCLS (2001) e as orientações dos fabricantes, utilizando-se cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *E. coli* (ATCC 25922). Os antimicrobianos testados foram: cefalosporina de primeira geração (cefalotina 10 μ g, Sensifar), de terceira geração (cefotaxima 30 μ g, Sensifar; ceftriaxona 30 μ g, Sensifar; ceftazidima 30 μ g, Cecon e cefpodoxima 30 μ g, Newprov) e de quarta geração (cefepima 30 μ g, Cecon), ceftazidima 30 μ g, Sensifar; aztreonam 30 μ g, Cecon; piperacilina-tazobactam 100/10 μ g, Oxoid; gentamicina 10 μ g, Sensifar; amicacina 30 μ g, Sensifar; sulfametoxazol-trimetoprim 25 μ g, Sensifar; ciprofloxacina 5 μ g, Newprov;

cloranfenicol 30 µg, Cecon; imipenem 10 µg, Sensifar; meropenem 10 µg, Oxoid e ertapenem 10 µg, BBL Merck.

4.7.6 Detecção fenotípica das ESBL

As cepas produtoras de ESBL foram identificadas fenotipicamente através das drogas chave definidas pelo NCCLS (2001): cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima, ceftriaxona e cefpodoxima) e monobactam (aztreonam). Os resultados destas drogas foram comparados quando testadas isoladamente e após associação com um bloqueador de beta-lactamase, o clavulanato. Foram utilizados métodos qualitativos e quantitativos, segundo o NCCLS (2001), e como controle de qualidade a cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603.

4.7.6.1 Triagem pelo halo e pela concentração inibitória mínima

Realizada a técnica de triagem por disco difusão e por determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizadas as drogas chave e os valores de halos e CIM para detecção de ESBL recomendadas pelo NCCLS (2001) (Anexo A). O teste de sensibilidade das *K. pneumoniae* foi interpretado segundo os critérios válidos para este gênero, selecionando as possíveis produtoras de ESBL (NCCLS, 2001).

4.7.6.2 Aproximação de discos

Foi utilizada a técnica de aproximação de discos (*double-disc synergism*, DDS) entre as drogas chave e um bloqueador de beta-lactamase (NCCLS, 2001).

O surgimento de uma “zona fantasma”, característica do bloqueio enzimático, foi interpretado como teste confirmatório positivo para a produção de ESBL (Figura 04)

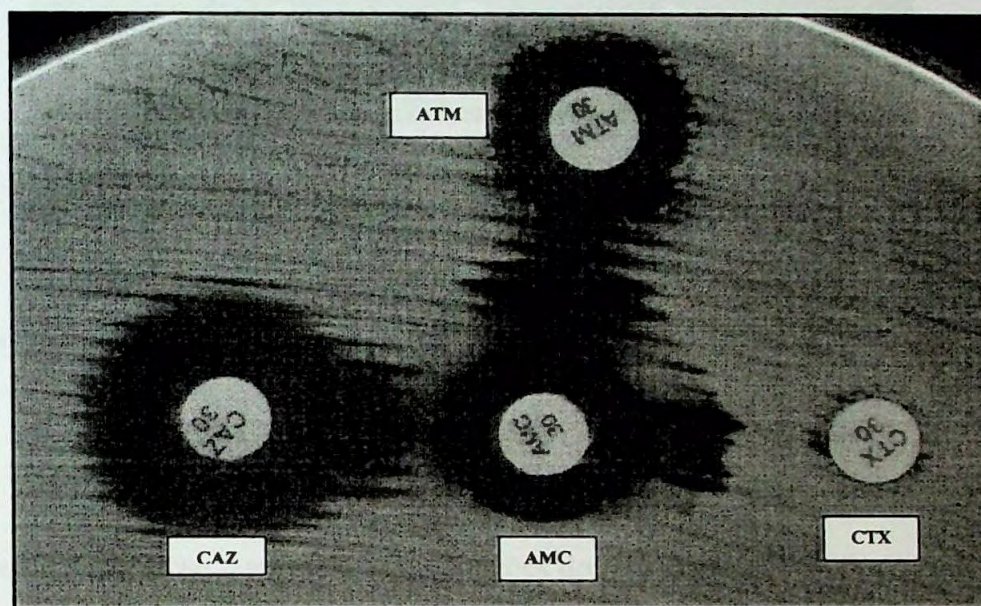


Figura 04- Detecção de ESBL através da técnica DDS. Utilizando amoxicilina-clavulanato e aztreonam, cefotaxima e ceftazidima. AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; ATM, aztreonam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima

Fonte: Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil (2001)

4.7.6.3 Discos de beta-lactâmicos combinados a inibidores de beta-lactamase

Foram utilizados discos combinados de cefpodoxima 10 μ g associada ao clavulanato 1 μ g, cefotaxima 30 μ g / clavulanato 1 μ g e ceftazidima 30 μ g / clavulanato 1 μ g,, todos da marca Oxoid^R (Inglaterra). Os halos de inibição formados com o uso destes discos foram comparados com os halos produzidos pela cefpodoxima 10 μ g, cefotaxima 30 μ g e ceftazidima 30 μ g testados isoladamente. Diferenças maiores de 5 mm entre os discos sem clavulanato e os discos combinados foram consideradas como teste positivo para ESBL (Figura 05.).

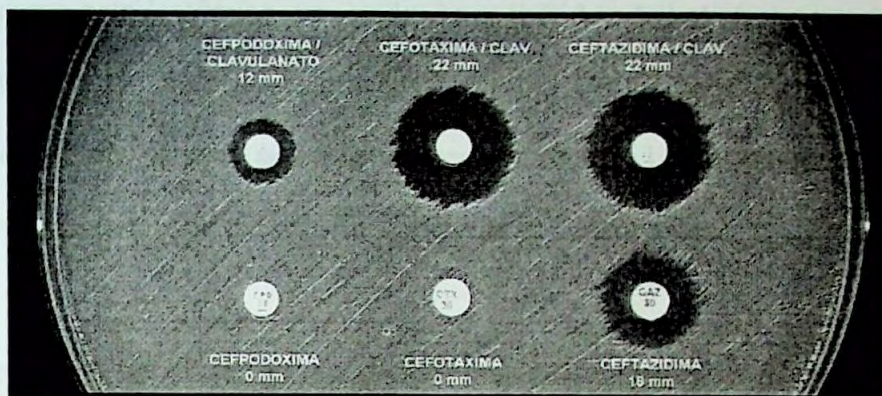


Figura 05- Detecção de ESBL através da comparação de discos com e sem clavulanato

Fonte: Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil (2001)

4.7.6.4 MicroScan^R

A detecção de ESBL por microdiluição foi realizada pelo sistema automatizado MicroScan^R, segundo as orientações do fabricante.

A programação do sistema automatizado MicroScan^R utiliza um filtro para as cepas identificadas como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*. O resultado da CIM para as drogas chave é avaliado com os valores para triagem de ESBL (Anexo A), neste caso não são utilizados os critérios usualmente válidos para as *Enterobacteriaceae*.

4.7.6.5 Etest^R

Método baseado no uso de tiras de polietileno impregnadas com antimicrobianos em escala de diluição, formando um gradiente de concentração da droga. Permite a realização do teste de sensibilidade quantitativo, fornecendo a CIM.

Foram utilizadas tiras específicas para a confirmação de ESBL contendo ceftazidima e ceftazidima/ac. clavulânico. Compostas por dois gradientes, em uma extremidade tem-se o beta-lactâmico de terceira geração (ceftazidima ou cefotaxima) e na

outra o mesmo beta-lactâmico associado a um inibidor de beta-lactamase. A comparação da CIM alcançada pelo microrganismo em ambas as extremidades permite a confirmação da produção de ESBL. O teste será positivo caso a relação beta-lactâmico/beta-lactâmico mais bloqueador de beta-lactamase seja >8 , conforme ilustram a Figura 06 e o Anexo B.

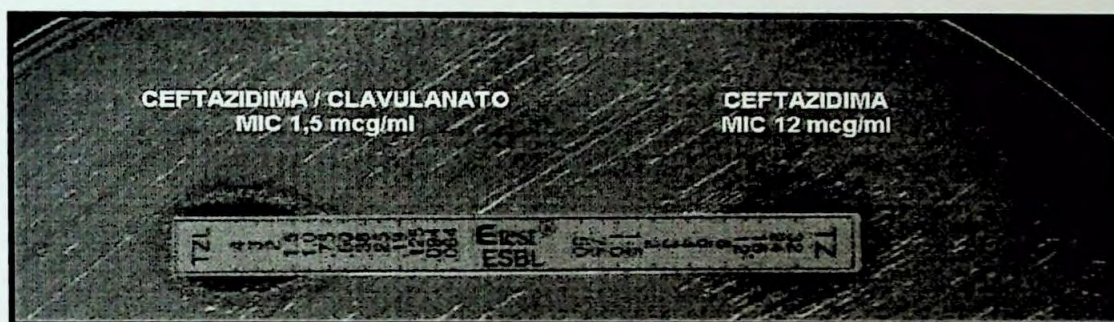


Figura 06- Detecção de ESBL através da tira de Etest^R. Contendo ceftazidima (TZ) na extremidade direita (CIM 12 $\mu\text{g/mL}$) e ceftazidima associada ao clavulanato (TZL) na extremidade esquerda (CIM 1,5 $\mu\text{g/mL}$). Teste positivo, com CIM de TZ >1 $\mu\text{g/mL}$ e relação TZ/TZL > 8

Fonte: Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil (2001)

4.7.7 Tipagem bacteriana

A tipagem busca definir as cepas procedentes de linhagens comuns e agrupá-las segundo a origem, do mesmo modo, deve evidenciar a ausência de relação entre aquelas de origem não comum. Em outras palavras, deve definir se cepas epidemiologicamente relacionadas são geneticamente relacionadas ou não, o que pode ser traduzido como poder de discriminação. Assim, define-se a hierarquia da disseminação dos microrganismos.

Para este fim, diferentes técnicas podem utilizar características fenotípicas ou características genotípicas.

4.7.7.1 Técnicas de fenotipagem

A fenotipagem é a observação de características decorrentes da expressão gênica e está sujeita a variações mesmo entre cepas geneticamente relacionadas.

4.7.7.1.1 Biotipagem

Foi realizada a biotipagem das cepas isoladas através de testes bioquímicos de utilização de substratos, definido pelo sistema automatizado MicroScan^R. Foram utilizadas as placas *Neg Urine Combo 3* (NUC 3) para isolados clínicos provenientes de urina e *Neg Combo 20* (NC 20) para os isolados de outros materiais. O Quadro 2 traz o painel das provas realizadas.

Quadro 2- Interpretação do painel de provas bioquímicas utilizadas pelas placas NUC 3 e NC 20 do sistema automatizado MicroScan^R

Fermentação de açúcares: Glicose Sucrose Sorbitol Rafinose Inositol Raminose Arabinose Adonitol Melobiose	A fermentação de um carboidrato resulta na acidificação do meio e alteração no indicador de pH
Produção de urease	Degradação de uréia formando amônia, que alcaliniza o meio e modifica o indicador de pH
Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)	Produção do gás H ₂ S a partir de tiosulfato de sódio, este reage com íons de ferro e resulta em precipitado de coloração preta
Formação de indol	Indica a metabolização do triptofano com formação de indol, visualizado na presença do reativo de Kovac's
Descarboxilação de aminoácidos: Lisina Arginina Ornitina	Descarboxilação de aminoácidos com formação de aminas que alcalinizam o meio e alteram os indicadores de pH
Desaminação de aminoácido: Triptofano	Metabolização do triptofano e formação do ácido indol pirúvico, que reage com citrato férrico de amônia, produzindo cor marron
Hidrolise da esculina	Hidrolise da esculina, detectada pelo citrato férrico de amônia através da formação de um precipitado preto
Reação de VP (Voges-Proskauer)	Produção de acetoina a partir de piruvato de sódio, visualizado após adição de hidróxido de potássio e alfa-naftol
Galactosidade (ONPG)	Hidrolise do ortofenil-beta-galactopiranosídeo, expressando uma coloração amarela sob luz visível
Utilização de carboidratos Citrato Malonato	Metabolização de carboidratos específicos com a acidificação do meio e alteração no indicador de pH
Tolerância antimicrobiana Colistina Cefalotina	Crescimento na presença de alguns antimicrobianos em concentrações definidas

Fonte: Sistema automatizado MicroScan^R, Dade Behring, Sacramento, CA

4.7.7.1.2 Antibiotipagem

Uma vez definidos os resultados de sensibilidade aos antimicrobianos testados, foi possível reunir as cepas segundo o padrão apresentado e definir grupos de perfis comuns.

4.7.7.2 Técnicas de genotipagem

A genotipagem é a observação da carga gênica e está menos sujeita a variações entre cepas geneticamente relacionadas.

4.7.7.2.1 Perfil plasmidial

Os plasmídeos são fitas de DNA extracromossômicas presentes em grande parte dos isolados clínicos. A determinação do perfil plasmidial foi o primeiro método de tipagem molecular desenvolvido e baseia-se na lise celular (em pH alcalino), seguida de uma eletroforese comum, em gel de agarose. As variações de presença, ausência e tamanho das bandas formadas, são os critérios utilizados para a tipagem (KADO & LIU, 1981).

Foi utilizada a técnica de Kado & Liu (1981), indicada para a extração de plasmídeos de diversos pesos (2,6 a 350 mega Daltons, MDa). Como marcadores de peso molecular foram utilizadas cepas padrão, com plasmídeos de peso conhecido: pR₂₇ (Tc), 110 MDa; pJPN₁₁ (Km), 66 MDa; pRP₄ (TC), 34 MDa; pSa (Km), 23 MDa.

As cepas foram crescidas em caldo TSB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma, EUA), sob agitação, por 16 a 18 horas e a 35± 1 ° C. Após centrifugação (30 segundos, 14.000 rpm), o sedimento foi lavado em 1 mL de solução tris EDTA (TE) (Tris-

HCl 50mM, EDTA 20mM, pH 8,0). Este procedimento foi repetido mais uma vez com o sedimento obtido, adicionado de 50 μ L de TE. Após, adicionou-se 400 μ L de tampão de lise (TE 1,5%, duodecil sulfato de sódio pH 12,45), os tubos foram invertidos delicadamente por 5 vezes e incubados a 60°C por 30 minutos. Realizado o resfriamento no gelo, foram adicionados 20 μ L de tris HCl (2M, pH 7,0) e 500 μ L de fenol-clorofórmio saturado em tris (50mM, pH 7,0). Invertido novamente por 5 vezes e centrifugado por 10 minutos (8.000 rpm). Foram retirados 60 μ L do sobrenadante e homogeneizados com 12 μ L de ficol (ficol 10%, azul de bromofenol 0,025% em TE) e aplicados em corrida vertical em gel de agarose 0,8% por 4 horas (100V, 60 mA). Por fim, o produto da corrida eletroforética foi visualizado com uma solução de brometo de etídio (1 μ L/mL) (Promega, EUA) sob luz UV.

O peso das bandas observadas foi calculado através de curva de regressão linear baseada na corrida dos plasmídios de referência, incluídos em todos os géis, segundo o programa "SEQUAID II – *Computed Standard Curve for DNA Gel*", versão 2,2, aplicativo do MS-DOS (1987).

4.7.7.2 Eletroforese em campo elétrico variável

Utilizou-se como padrão ouro para a tipagem a técnica de eletroforese em campo elétrico variável (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE) (SCHWARTZ e CANTOR, 1984). Para a restrição do DNA cromossômico das 73 amostras selecionadas, mais as quatro cepas controle, foi utilizada a enzima *Xba*I (Fermentas, EUA).

A técnica de PFGE é uma variação da eletroforese convencional, com a diferença de o campo elétrico apresentar diferentes orientações. Esta variação do campo permite a resolução de grandes fragmentos de DNA, o que seria impossível com a eletroforese tradicional (PFALER, HOLLIS e SADER, 1992).

As amostras foram crescidas em caldo TSB por 18 a 24 horas, a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ e centrifugadas por 15 minutos (11.000 rpm). O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de solução salina e transferido para um tubo de microcentrífuga, previamente pesado, que foi centrifugado durante 15 minutos (11.000 rpm a 4°C). Após o descarte do sobrenadante este procedimento foi repetido por mais duas vezes. O tubo contendo o sedimento lavado foi novamente pesado, assim se definiu o peso do sedimento bacteriano. Conforme a massa bacteriana obtida, foi adicionado EDTA 25mM pH 8,0 até formar uma suspensão com 100 μg de bactérias por microlitro. Em um novo tubo foram adicionados 25 μL desta suspensão, 225 μL de tampão TEN (Tris 0,1M, pH 7,5; EDTA 0,1M; NaCl 0,1M) e 225 μL de agarose de baixo ponto de fusão (BioRad, EUA); após homogeneização foram montados os blocos de agarose com a suspensão de bactérias incorporada ao agar. Solidificados, os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de células contendo tampão EC (Tris 6mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 100mM, pH 7,5; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2%) e 200 μL de lisozima (Sigma, EUA) e incubados por cinco horas a 37°C .

Ao final deste período, foi retirado o tampão EC e feita a lavagem dos blocos com 2 mL de tampão CHEF-TE (Tris 0,1M, pH 7,5; EDTA 0,1M, pH 7,5) por duas vezes. Na segunda lavagem, os blocos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois de retirado o tampão CHEF-TE, foram colocados em 2 mL de tampão ES, com 100 μL de proteínaase K (20 mg/mL) (Invitrogen, EUA), e incubado por 18 horas a 50°C . Concluída a incubação foi retirado o tampão ES e foram realizadas cinco lavagens com 2 mL de tampão CHEF-TE, com incubações de 1 hora após a segunda lavagem.

A restrição do DNA cromossômico foi feita com a enzima *Xba*I (20 unidades por amostra). Em uma placa de cultura de células de 96 poços foi adicionado 300 μL de tampão DNS e metade do bloco de agarose de cada uma das amostras. Foram feitas cinco lavagens com DNS, com incubações de 1 hora a temperatura ambiente após a segunda

lavagem. Após a quinta lavagem foi adicionado 100 μ L do tampão da enzima diluído 10 vezes (sem a enzima) e incubado a 5°C por uma hora. Ao final, foi retirado o tampão e adicionado novo tampão, agora com a enzima utilizada, e feita nova incubação a 5°C por duas horas, seguida de outra a 37°C por 15 horas.

A corrida foi realizada em gel de agarose a 1% (BioRad, EUA) em tampão TBE 0,5x (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M). Utilizada a forma CHEF de PFGE e o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, EUA). O padrão de variação da corrente elétrica (*switch time*) foi de 5 a 55 segundos, com tempo total de corrida de 22 horas em solução de TEB 0,5x adicionado de 200 μ L de tiuréia (0,5M), a uma temperatura de 14°C e sob corrente de 200 volts (6V/cm). Os géis foram corados com solução de brometo de etídio (1 μ L/mL) (Promega, EUA) por 40 minutos, descorados em água Milli-Q^R por mais 40 minutos e fotografados sob luz UV com filme Polaroid^R.

Para a avaliação do poder discriminatório da técnica, além das cepas epidemiologicamente não relacionadas do HURNP, foram incluídas cepas de *K. pneumoniae* ATCC1383 e *E. coli* ATCC25922, além de outras previamente tipadas em diferentes estudos: uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de SHV-18, do programa *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology* (ICARE) e uma *K. pneumoniae* ESBL causadora de surto na UTI-Neo do Hospital Geral de Itapecirica da Serra, São Paulo (dados ainda não publicados). Estas cepas foram gentilmente cedidas pela Dra. Silvia Figueiredo Costa do Laboratório de Investigação Médica (LIM) 54, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A análise e interpretação das cepas foram feitas com base na similaridade do perfil de bandas apresentado, segundo critérios estabelecidos por Tenover *et al.* (1995) (Quadro 3).

Quadro 3- Critérios para interpretação de padrões de bandas gerados por PFGE, segundo Tenover et al (1995)

Categoria	Número de diferenças, comparado à cepa do surto	Interpretação epidemiológica
Indistinguível	0	Geneticamente relacionado
Fortemente relacionado	2-3	Provavelmente geneticamente relacionado
Possivelmente relacionado	4-6	Possivelmente geneticamente relacionado
Diferente	≥ 7	Geneticamente não relacionado

Fonte: Adaptado de Tenover *et al* (1995)

A classificação inicial dos níveis de similaridade deu-se por observação visual, seguida da montagem de um dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Dice e a construção dos dendogramas foi baseada na análise de *clusters* UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*).

4.8 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

O presente estudo foi analisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) do HURNP e da FCF/USP por estar em conformidade com a Resolução 196/96, através dos pareceres 011/02 de 19 de março de 2002 e do Ofício CEP nº 10 de 10 de março de 2003, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Vigilância da microbiota da UN

Durante o período de estudo (2000 a 2002), foram colhidas 2.223 culturas dos RN internados na UN, incluindo culturas de vigilância e de sítios infectados. A vigilância da microbiota colonizante totalizou 720 culturas; sendo colhidas 146 culturas no ano de 2000, 283 em 2001 e 291 em 2002. Foram ainda colhidas 1503 culturas buscando o diagnóstico e a terapêutica de quadros infecciosos nos RN; totalizando 484 em 2000, 498 em 2001 e 521 em 2002. Tais rotinas permitiram retratar os agentes bacterianos mais frequentes na unidade, bem como o seu padrão de sensibilidade. Com base nestas informações foi possível definir a endemicidade da microbiota circulante na UN durante os três anos do estudo. Neste período as culturas de vigilância incluíram material de orofaringe, material retal, nasal, retroauricular e aspirado gástrico. As culturas que objetivaram a investigação diagnóstica e a terapêutica incluíram líquido, sangue, urina, raspado conjuntival, secreção de onfalite e secreção de abscessos.

5.1.1. Descrição da microbiota da UN

Foi avaliada a frequência de isolamento de todos os microrganismos isolados na UN entre 2000 e 2002. Os agentes foram agrupados em enterobactérias, não fermentadores, cocos Gram-positivos e leveduras (Figura 07). Foi observado o limite de réplica de 72 horas entre cada cultura e semelhança na topografia de isolamento. Culturas com uma mesma espécie dentro destas condições caracterizaram amostras em duplicata e foram computadas apenas na primeira cultura.

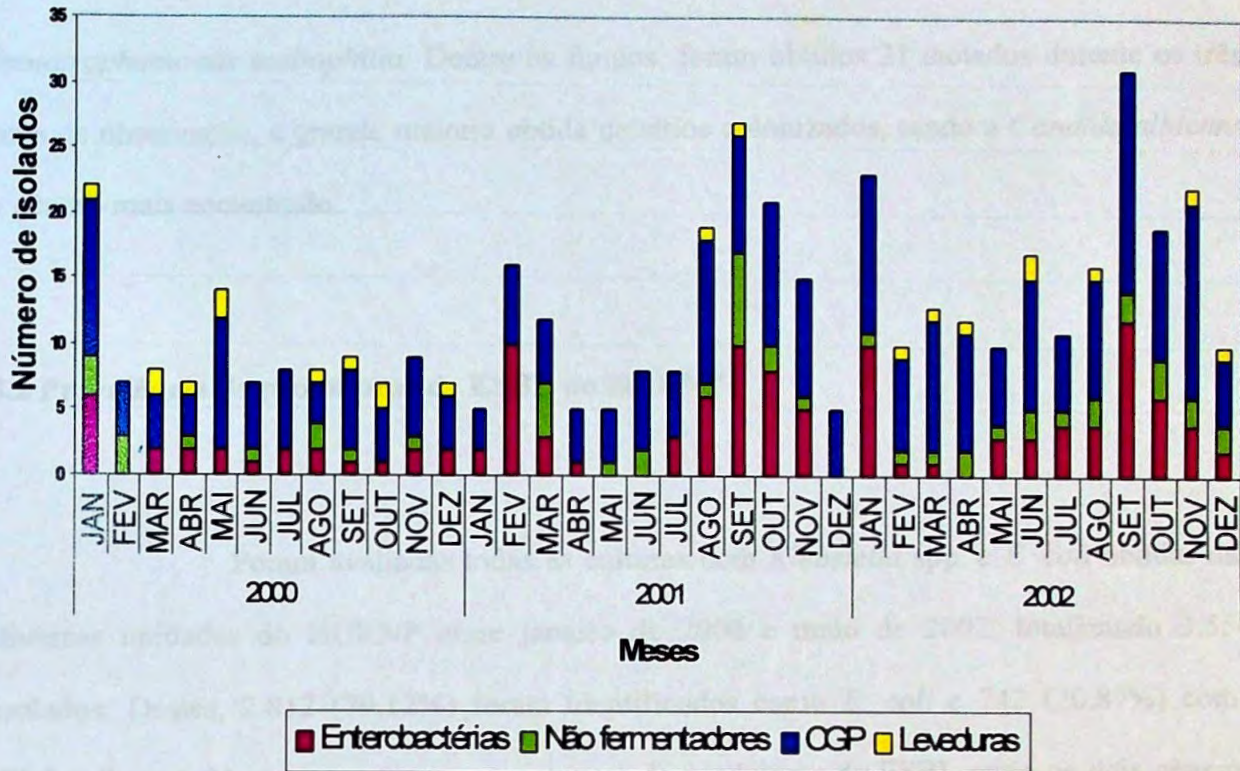


Figura 07- Incidência de enterobactérias, não fermentadores, cocos Gram-positivo e leveduras isoladas na UN do HURNP, no período de 2000 a 2002

Fonte: Arquivos do Laboratório de Microbiologia do HURNP

Segundo o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, o número de isolados obtidos mês a mês não seguiu uma distribuição normal. Dentre os isolados, os cocos Gram-positivos foram o grupo de maior frequência de isolamento, com uma mediana de 6 (3-17) isolados nos 36 meses observados. Dentre eles, os estafilococos coagulase negativa foram os agentes mais encontrados, com uma mediana de 5 (1-13) isolados, inclusive alcançando a maior frequência de isolamento dentre todos os grupos avaliados. O segundo agente foi o *Staphylococcus aureus*, seguido pelos *Enterococcus spp.*. Entre as enterobactérias a mediana de isolados no período foi de 2 (0-12) sendo que os gêneros mais prevalentes foram: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marscessens* e *Proteus spp.*. As não fermentadoras apresentaram mediana de 1 (0-7) isolado e foram representadas pela *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, além de alguns casos agrupados de

Stenotrophomonas maltophilia. Dentre os fungos, foram obtidos 21 isolados durante os três anos de observação, a grande maioria obtida de sítios colonizados, sendo a *Candida albicans* o gênero mais encontrado.

5.2 Prevalência de produtoras de ESBL no HURNP

Foram avaliadas todas as culturas com *Klebsiella* spp. e *E. coli* obtidas das diversas unidades do HURNP entre janeiro de 2000 e maio de 2002, totalizando 3.554 isolados. Destes, 2.812 (79,12%) foram identificados como *E. coli* e 742 (20,87%) como *Klebsiella* spp. Neste universo, a porcentagem de produtoras de ESBL entre os dois gêneros se comportou de maneira distinta. Em termos percentuais, enquanto o número de *K. pneumoniae* ESBL oscilou em torno de 28,32% ($\pm 3,86$), a *E. coli* manteve uma tendência constante de aumento, chegando a um aumento relativo de 39,8%, quando comparados os anos de 2000 e 2002 (Figura 08).

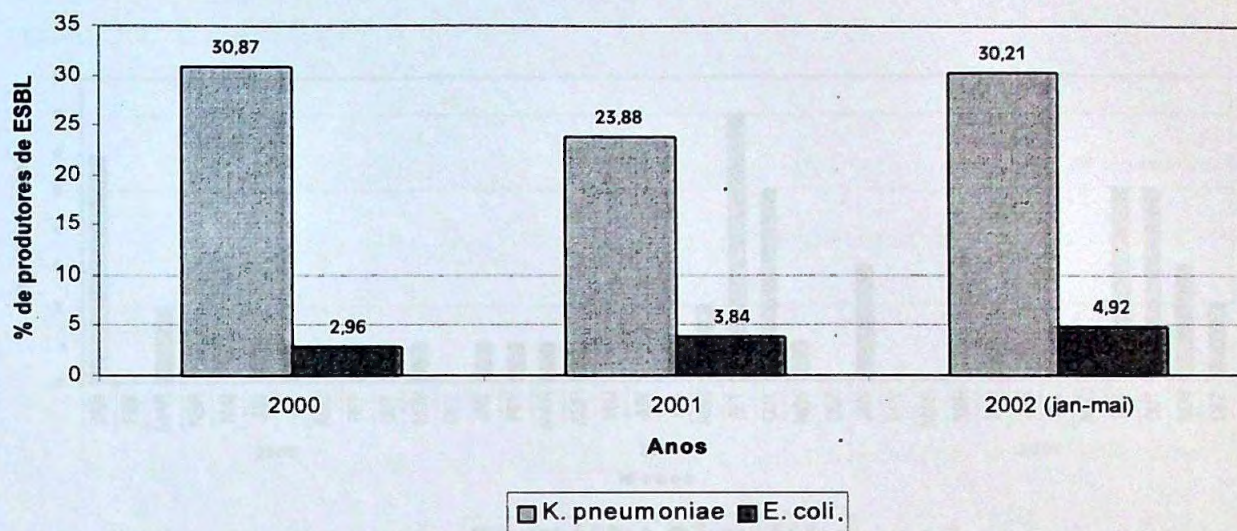


Figura 08- Prevalência de *K. pneumoniae* e *E. coli* ESBL isoladas de pacientes internados no HURNP, no período de janeiro de 2000 a maio de 2002

5.3. Incidência de *K. pneumoniae* e *E. coli* na UN

Foi observada a incidência de *K. pneumoniae* e de *E. coli* na UN entre janeiro de 2000 e dezembro de 2002, bem como seu comportamento quanto à produção de ESBL (ESBL+) ou não produção (ESBL-).

Na maior parte do período, o isolamento de *E. coli* apresentou baixos níveis endêmicos, entretanto, com alguns pontos de exceção nos meses de janeiro de 2000, segundo semestre de 2001 e segundo semestre de 2002. Ainda assim, a frequência de cepas produtoras de ESBL permaneceu constante durante toda a observação, com uma média de 2,6 casos por ano (Figura 09).

Excetuando-se o período do surto, o isolamento de *K. pneumoniae* manteve uma baixa endemicidade, sendo a presença de cepas produtoras de ESBL restrita a este período (Figura 09a).

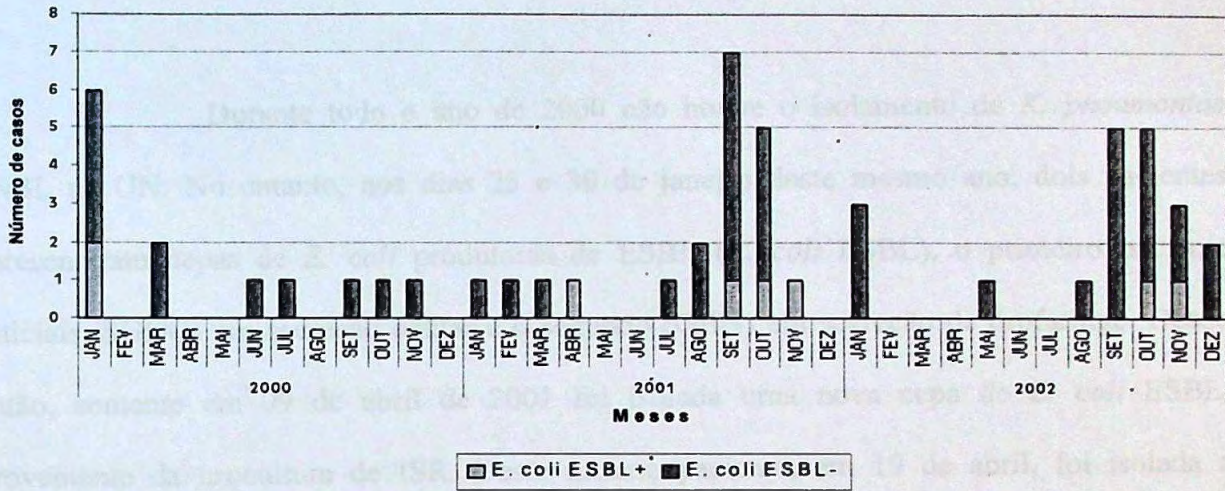


Figura 09- Incidência de *E. coli* na UN no período de 2000 a 2002 e a frequência de produtoras e não produtoras de ESBL

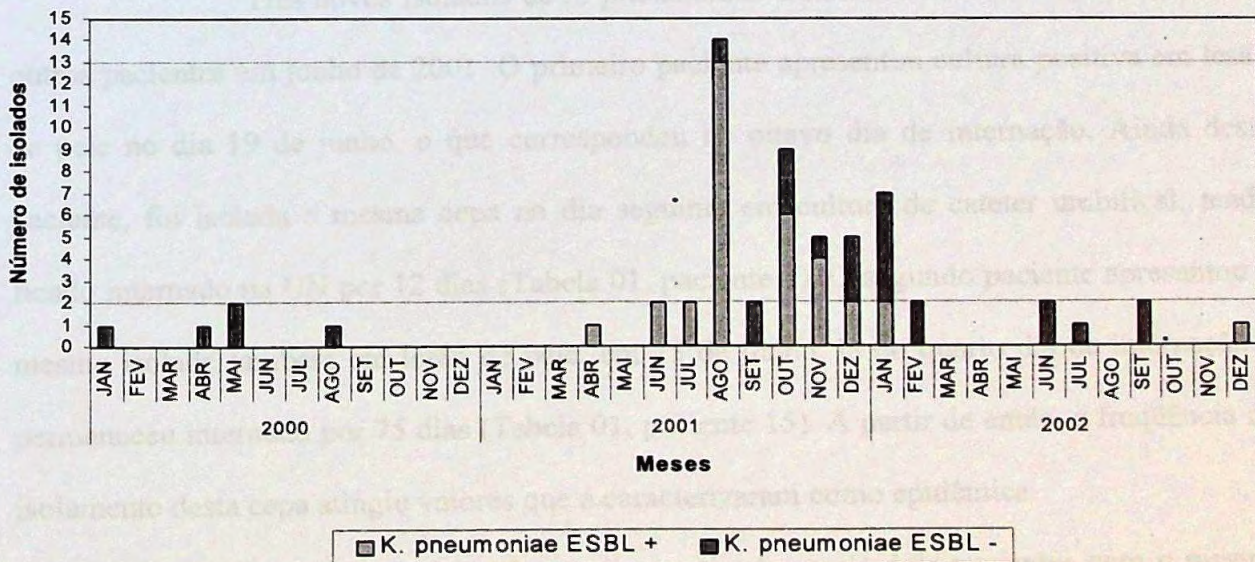


Figura 09a- Incidência de *K. pneumoniae* na UN no período de 2000 a 2002 e a frequência de produtoras e não produtoras de ESBL

5.4 Descrição do surto na UN

Durante todo o ano de 2000 não houve o isolamento de *K. pneumoniae* ESBL na UN. No entanto, nos dias 25 e 30 de janeiro deste mesmo ano, dois pacientes apresentaram cepas de *E. coli* produtoras de ESBL (*E. coli* ESBL), o primeiro paciente (iniciais, SHDG) em secreção ocular e o segundo (GBN) em secreção de orofaringe. Desde então, somente em 09 de abril de 2001 foi isolada uma nova cepa de *E. coli* ESBL, proveniente da urocultura de ISR. Deste mesmo paciente, em 19 de abril, foi isolada a primeira cepa de *K. pneumoniae* ESBL, em secreção purulenta de onfalite. Esta cultura apresentou uma *E. coli* ESBL, uma *K. pneumoniae* ESBL e um Estafilococo coagulase negativa. Novos isolados de *E. coli* ESBL foram obtidos somente em 18 de setembro, em cultura de orofaringe de ICMG; em 8 de outubro, em orofaringe de EBMM e 29 de novembro, em secreção de onfalite de LRN.

Três novos isolados de *K. pneumoniae* ESBL foram documentados em dois outros pacientes em junho de 2001. O primeiro paciente apresentou cultura positiva em lesão de pele no dia 19 de junho, o que correspondeu ao oitavo dia de internação. Ainda deste paciente, foi isolada a mesma cepa no dia seguinte em cultura de cateter umbilical, tendo ficado internado na UN por 12 dias (Tabela 01, paciente 1). O segundo paciente apresentou o mesmo isolado também em lesão de pele, em 25 de junho, já no quarto dia de internação e permaneceu internado por 75 dias (Tabela 01, paciente 15). A partir de então, a frequência de isolamento desta cepa atingiu valores que a caracterizaram como epidêmica.

No mês seguinte, foram diagnosticados mais dois pacientes com o mesmo agente. O primeiro, em 12 de julho, com bacteremia transitória e infecção primária do acesso venoso documentadas através de hemocultura e cultura semiquantitativa de ponta de cateter

(Tabela 01, paciente 3) e o segundo em 23 de julho, com conjuntivite diagnosticada no sexto dia de internação (Tabela 01, paciente 16).

Em agosto, como pode ser observado mais detalhadamente nas Tabelas 01 e 01a, foram mais três novos pacientes infectados em diferentes sítios. Seguidos de um novo paciente em setembro, um em outubro e dois em novembro de 2001. Novos casos de infecção por *K. pneumoniae* não foram documentados até o final do estudo, no período pós-surto.

No período anterior a janeiro de 2000 não foi possível monitorar o isolamento de produtores de ESBL.

Tabela 01- Relação dos neonatos infectados e/ou colonizados por *K.pneumoniae* ESBL, internados inicialmente na UTI-Neo, em ordem cronológica de internação

Paciente	Idade gestacional (semanas)	Peso ao nascer (g)	Boletim Apgar 1'-5'	Data da internação na UN	Data e n° das culturas	Dias de internação na data do isolamento	Dias de internação total	Sítio de isolamento	Status clínico do isolado
1	26s	530	1-4	11.06.01	19.06.01 11166	8	12	Sç. Pele	Infecção
					20.06.01 11168	9		Cateter umbilical	Infecção
2	28s	745	1-8	03.07.01	29.08.01 2644	57	116	Orofaringe	colonização
					06.09.01 2752	65		Orofaringe	colonização
					18.09.01 2999	77		Orofaringe	colonização
					08.10.01 3324	97		Nasal	colonização
					08.10.01 3325	97		Orofaringe	colonização
					19.10.01 3439	108		Orofaringe	colonização
3	33s3d	1820	8-8	05.07.01	12.07.01 717	7	19	Sangue	Bacteremia
					12.07.01 701	7		Cateter	Infecção
					23.07.01	18		Cateter ^a	colonização
4	26s4d	800	10-10	19.07.01	29.08.01 2651	41	131	Orofaringe	colonização
					11.09.01 2888	54		Nasal	colonização
					11.09.01 2889	54		Orofaringe	colonização
					11.09.01 2887	54		Retal	colonização
					18.09.01 2994	61		Orofaringe	colonização
					18.09.01	61		Orofaringe	colonização
					25.09.01 3218	68		Axi/ingu	colonização
					01.10.01 3240	74		Orofaringe	colonização
					08.10.01 3330	81		Orofaringe	colonização
					22.10.01 3462	95		Orofaringe	colonização
					22.10.01 3463	95		Nasal	colonização
07.11.01 3615	111	Orofaringe	colonização						
5	30s4d	1540	2-8	05.08.01	29.08.01 2638	24	36	Orofaringe	colonização
					06.09.01 2750	32		Orofaringe	colonização
					06.09.01 2751	32		Nasal	colonização
6	30s4d	1580	2-8	05.08.01	29.08.01 2639	24	34	Orofaringe	colonização
					06.09.01 2744	32		Orofaringe	colonização
					06.09.01 2745	32		Nasal	colonização
7	37s6d	3775	2-8	12.08.01	20.08.01 3127	08	33	Sangue	Infecção
					20.08.01	08		Urina	Infecção

Paciente	Idade gestacional (semanas)	Peso ao nascer (g)	Boletim Apgar 1'-5'	Data da internação na UN	Data e nº das culturas	Dias de internação na data do isolamento	Dias de internação total	Sítio de isolamento	Status clínico do isolado
					3112				
					20.08.01	08		Cateter	Infecção
					04.09.01	23		Orofaringe	colonização
					06.09.01	25		Orofaringe	colonização
					2738				
					12.09.01	31		Cateter	Infecção
					5102				
8	28s	935	7-8	12.08	21.08.01	09	59	Ocular	colonização
					3228				
					04.09.01	23		Orofaringe	colonização
					06.09.01	25		Nasal	colonização
					2761				
					18.09.01	37		Orofaringe	colonização
					2989				
					08.10.01	57		Orofaringe	colonização
					3323				
9	26s4d	1030	8-10	14.08.02	29.08.01	15	56	Orofaringe	colonização
					2646				
					06.09.01	23		Orofaringe	colonização
					2758				
					06.09.01	23		Nasal	colonização
					2759				
					18.09.01	35		Orofaringe	colonização
					3002				
					08.10.01	55		Nasal	colonização
					3328				
					08.10.01	55		Orofaringe	colonização
					3329				
10	32s23d	2130	8-10	24.08.01	29.08.01	05	32	Orofaringe	colonização
					2635				
					06.09.01	13		Orofaringe	colonização
					2748				
					06.09.01	13		Nasal	colonização
					2749				
					18.09.01	25		Nasal	colonização
					2995				
					18.09.01	25		Orofaringe	colonização
					2996				
					13.11.01	50º dia após alta		Urina	infecção
					6878				
11	29s3d	1165	6-8	20.10.01	27.11.01	07	48	Orofaringe	colonização
12	30s4d	1420	8-9	23.11.01	18.12.01	26	32	Orofaringe	colonização
13	31s	1555	7-10	06.01.02	16.01.02	10	28	Retal	colonização
14	30s	1275	6-10	23.01.02	28.01.02	05	76	Orofaringe	colonização
					6020				
					04.02.02	12		Orofaringe	colonização
					6073				
					08.02.02	16		Orofaringe	colonização
					13.02.02	21		Orofaringe	colonização
					6114				
					06.03.02	42		Orofaringe	colonização
					6443				
					20.03.02	56		Orofaringe	colonização
					6591				
					20.03.02	56		Orofaringe	colonização
					6590				

^a Cateter < 15ufc: cultura semi-quantitativa de ponta de cateter com contagem inferior a 15 unidades formadoras de colônia, resultado de baixo valor preditivo positivo para quadro infeccioso

Fonte: Serviço de Arquivo Médico, HURNP

Tabela 01a- Relação dos neonatos infectados e/ou colonizados por *K.pneumoniae* ESBL, internados inicialmente na UCI, em ordem cronológica de internação

Paciente	Idade gestacional (semanas)	Peso ao nascer (g)	Boletim Apgar 1'-5'	Data da internação na UN	Data e nº das culturas	Dias de internação na data do isolamento	Dias de internação total	Sítio de isolamento	Status clínico do isolado
15	28s4d	885	7-9	21.06.01	25.06.01 11391	04	75	Sç. Pele	Infecção
					13.08.01 2637	53		Urina	Infecção
					29.08.01 2643	69		Orofaringe	colonização
16	38s	3010	8-10	17.07.01	23.07.01 1339	06	15	Sç. Ocular	Infecção
17	35s	2735	8-10	24.07.01	06.08.01 2237	13	135	Sangue	Infecção
					04.09.01	38		Orofaringe	colonização
					06.09.01 2754	40		Orofaringe	colonização
					17.09.01	51		Sç. Ocular	Infecção
					18.09.01 2997	52		Orofaringe	colonização
					18.09.01 2998	52		Nasal	colonização
					26.09.01 5645	60		Cateter	Infecção
					02.10.01 3268	67		Orofaringe	colonização
					07.11.01	102		Nasal	colonização
					09.11.01 6822	108		Sangue	Infecção
18				27.07.01	29.08.01 2636	33	38	Orofaringe	colonização
19				03.08.01	08.08.01 2367	05	7	Cateter ^a	colonização
20				11.08.01	20.08.01 3099	09	45	Urina	Infecção
					20.08.01 3125	09		Sangue	Infecção
					20.08.01 3177	09		Cateter	Infecção
					04.09.01	24		Orofaringe	colonização
					06.09.01 2740	26		Orofaringe	colonização
					18.09.01 2986	38		Orofaringe	colonização
21	33s	2490	2-8	13.08.01	30.08.01 2640	17	24	Orofaringe	colonização
22	32s	1515	6-9	20.08.01	29.08.01 2647	09	36	Orofaringe	colonização
					06.09.01 2736	17		Orofaringe	colonização
					06.09.01 2737	17		Nasal	colonização
					06.09.01 4813	17		Sç. Ocular	Infecção
23	32s2d	1230	10-10	20.08.01	29.08.01 2641	09	48	Orofaringe	colonização
					18.09.01 3003	29		Orofaringe	Colonização
24	28s4d	1010	2-7	30.09.01	23.10.01 6354	23	59	Urina	Infecção
					06.11.01 3598	37		Orofaringe	colonização

Paciente	Idade gestacional (semanas)	Peso ao nascer (g)	Boletim Apgar 1'-5'	Data da internação na UN	Data e nº das culturas	Dias de internação na data do isolamento	Dias de internação total	Sítio de isolamento	Status clínico do isolado
25	34s4d	1955	8-10	17.10.01	29.10.01 3527	12	16	Orofaringe	colonização
26	36s4d	4280	8-10	17.10.01	29.10.01 3537	12	18	Orofaringe	colonização
27	37s4d	3755	8-10	19.10.01	05.11.01 6691	17	52	Urina	infecção
					05.11.01 6694	17		Cateter	infecção
					06.11.01	18		Incisão	Infecção
28	36s3d	1870	6-8	21.10.01	17.11.01 6966	27	28	Cateter ^a	colonização
29	35s2d	2350	9-9	22.10.01	29.10.01 3530	07	9	Nasal	colonização
					29.10.01 3531	07		Orofaringe	colonização
30	34s3d	2030	8-10	23.11.01	29.11.01 8221	06	10	Sç umbilical	Infecção
31	32s	1855	9-10	02.12.01	18.12.01 3956	16	18	Orofaringe	colonização
					18.12.01 3955	16		Nasal	colonização
32 pós- erradicação ^b	26s	865	6-8	16.09.02	17.12.02	62	112	Orofaringe	colonização

^a Cultura de ponta de cateter com >15 ufc considerada como colonização por não haver hemocultura positiva, clínica compatível com quadro infeccioso ou uso de terapia antibiótica

^b Cepa de *K. pneumoniae* ESBL isolada em dezembro de 2002, após a erradicação da cepa epidêmica que teve seu último registro em 20 de março de 2002 (paciente 14)

Fonte: Serviço de Arquivo Médico, HURNP

A Figura 10 ilustra os dados das Tabelas 1 e 1a, onde estão identificados todos os isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL obtidos entre 2000 e 2002. Foram computadas todas as culturas colhidas e considerada apenas a primeira cultura positiva dos sítios infectados ou colonizados. Os pacientes que tiveram a primeira cultura com a cepa epidêmica em sítio infectado foram tabulados como infectados e colonizados. Totalizando o período do surto, foram 31 pacientes com cultura positiva para a cepa epidêmica, sendo que em 11 deles foi possível determinar a relação com quadros infecciosos; enquanto que os 20 pacientes restantes permaneceram exclusivamente colonizados. Analisando os períodos pré- e pós-surto, foram diagnosticadas apenas duas colonizações, a primeira em abril de 2001 e a segunda em dezembro de 2002.

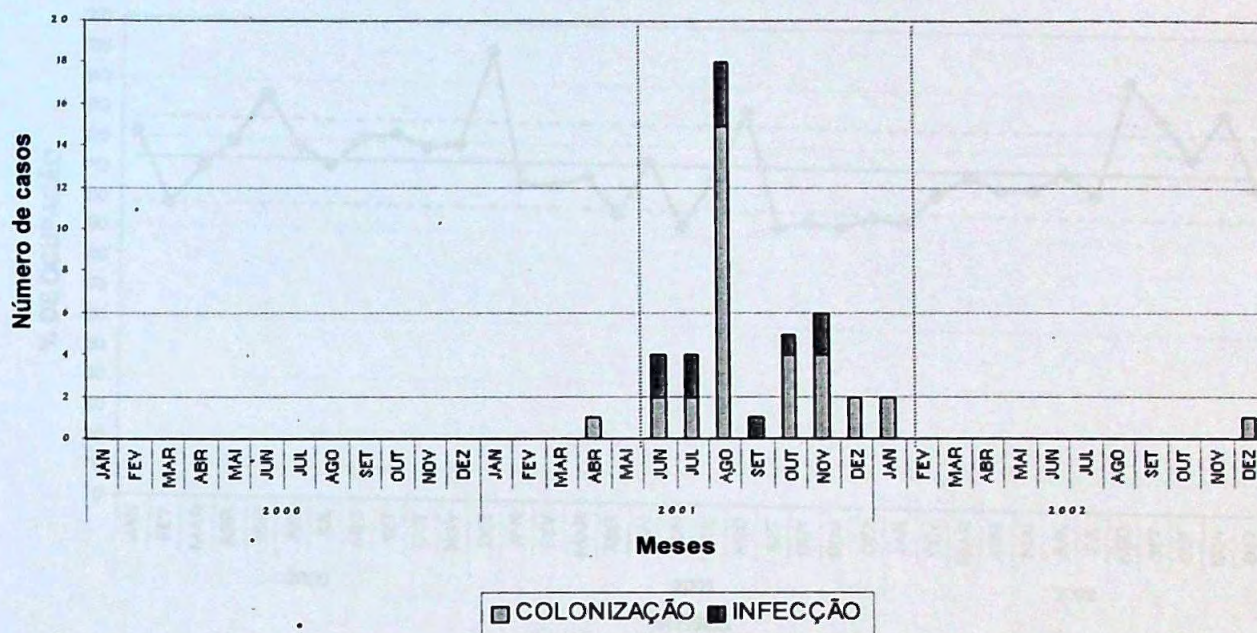


Figura 10- Incidência dos pacientes infectados e colonizados no período compreendido entre janeiro de 2000 e dezembro de 2002

5.5 A Unidade de Neonatologia

A UN do HURNP é marcada pela elevada demanda de recém natos. A média da taxa de ocupação entre 2000 e 2002 permaneceu em 113% ($\pm 19,7$); oscilando entre 93% em junho de 2001 e 150% em dezembro de 2000. Nos meses de junho a agosto de 2001 foi observada uma tendência crescente na ocupação, passando da menor taxa no período, 93%, para 109% e 132%, respectivamente (Figura 11).

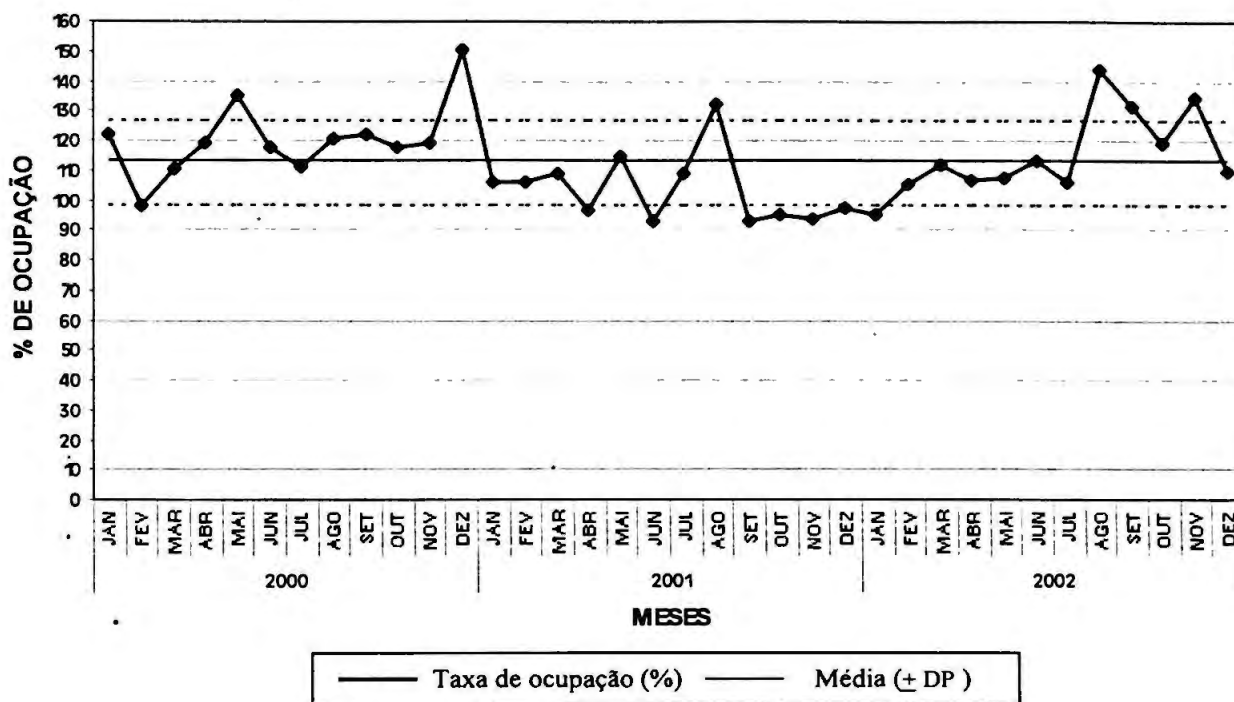


Figura 11- Média das taxas de ocupação da UN durante os anos de 2000, 2001 e 2002
Fonte: Serviço de Arquivo Médico, HURNP

5.5.1 Vigilância epidemiológica

As informações de pacientes infectados, colonizados e número total de infecções foram agrupadas em densidade de incidência (DI) de pacientes infectados, DI do total de infecções e prevalência mensal de pacientes colonizados e infectados (Figura 12).

Em agosto de 2001 foi verificada a ascensão de todos os critérios observados. O ajuste do número de novos pacientes infectados por 100 pacientes-dia revelou uma DI estável nos meses de junho, com 0,42 infectados/100 pacientes-dia; julho, com 0,35 e agosto, com 0,42. Após a intervenção da CCIH, feita em 27 de agosto, observou-se o declínio nos meses de setembro (0,21) e outubro (0,2), entretanto retornando aos valores iniciais em novembro (0,42), quando as medidas foram reforçadas, sendo que a partir de dezembro não foram documentados novos casos de infecção pela cepa epidêmica na UN.

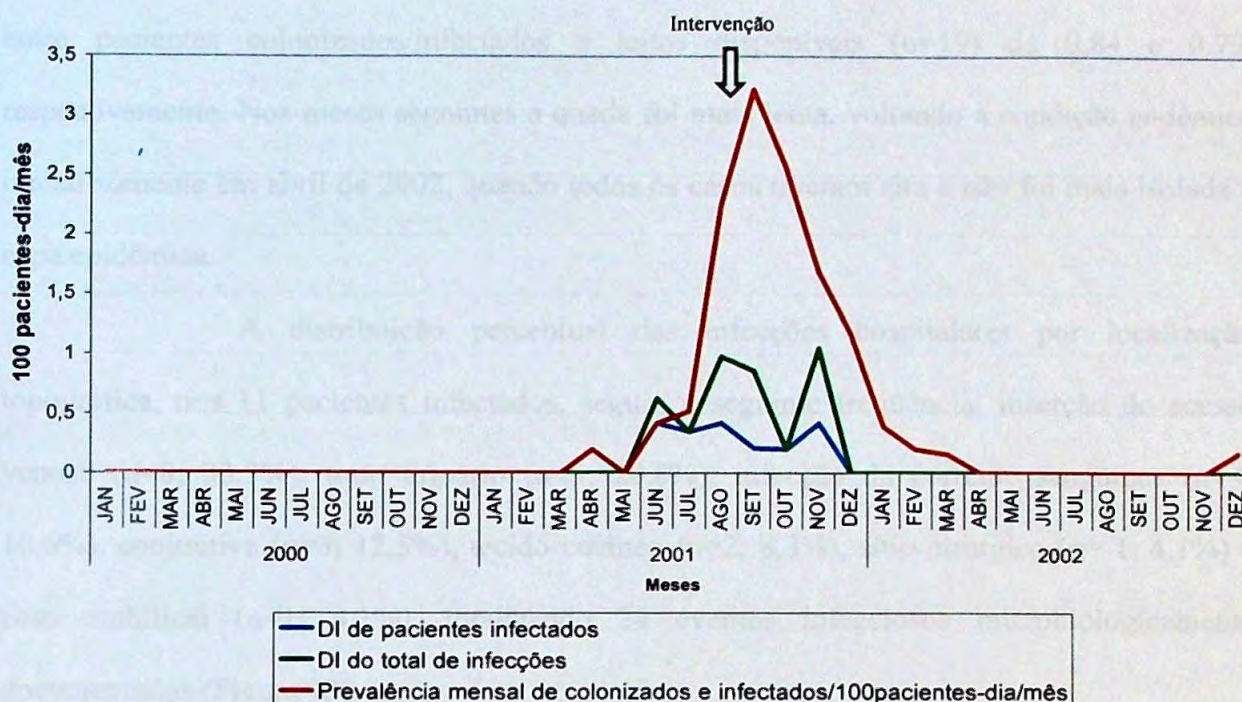


Figura 12- Densidade de incidência (DI) de pacientes infectados, DI do total de infecções e prevalência mensal de pacientes infectados e colonizados, corrigidos para 100 pacientes-dia/mês, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2002

A DI das infecções causadas pela cepa epidêmica oscilou no período observado. Em junho foram 0,63 infecções em 100 pacientes-dia/mês, caindo para 0,35 no mês seguinte e voltando a subir em agosto, quando alcançou 0,98. Após as medidas de intervenção, o número de novas infecções voltou a cair por dois meses consecutivos, em setembro foi de 0,86 e em outubro de 0,2. Em novembro houve um novo aumento, chegando a 1,05 infecções em 100pacientes-dia/mês, acompanhado de novo decréscimo e ausência de infecções pela cepa epidêmica a partir de dezembro.

A prevalência de pacientes infectados ou colonizados foi mensalmente monitorada, deste modo foi possível observar o seu rápido aumento até os meses de agosto, com 16 pacientes internados, e setembro com 15 pacientes internados. Neste período, foi alcançada a prevalência de 2,25 e 3,22 pacientes portadores da cepa epidêmica por 100 pacientes-dia/mês, o que significou o período de maior pressão de colonização e uma relação

entre pacientes colonizados/infectados e leitos disponíveis ($n=19$) de 0,84 e 0,79, respectivamente. Nos meses seguintes a queda foi mais lenta, voltando à condição endêmica inicial somente em abril de 2002, quando todos os casos tiveram alta e não foi mais isolada a cepa epidêmica.

A distribuição percentual das infecções hospitalares por localização topográfica, nos 11 pacientes infectados, seguiu a seguinte frequência: inserção do acesso venoso ($n=8$; 33,3%), trato urinário ($n=5$; 20,8%), infecção da corrente sanguínea ($n=4$; 16,6%), conjuntiva ($n=3$; 12,5%), tecido cutâneo ($n=2$; 8,3%), sítio cirúrgico ($n=1$; 4,1%) e coto umbilical ($n=1$; 4,1%), totalizando 24 eventos infecciosos microbiologicamente documentados (Figura 13).

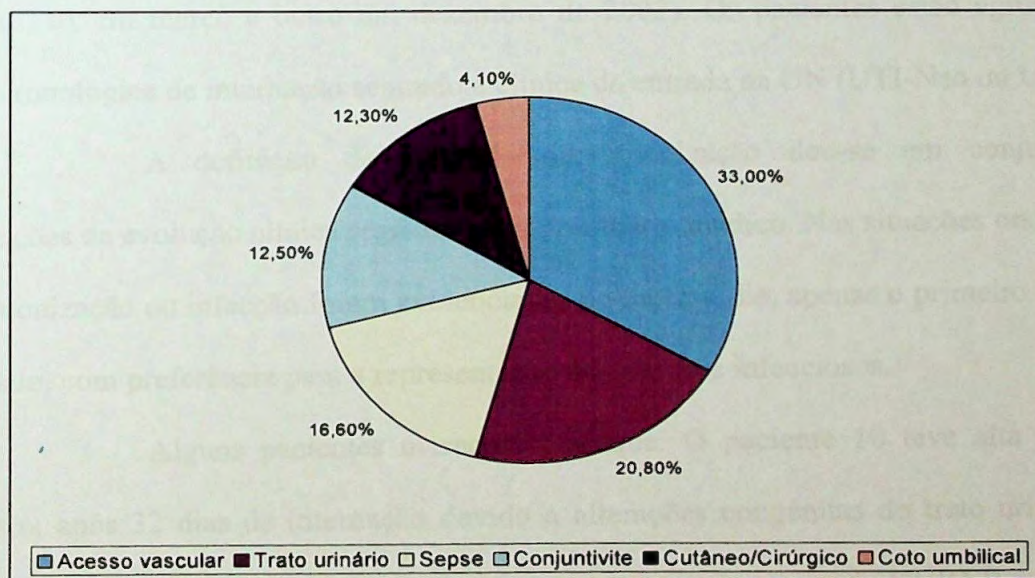


Figura 13- Distribuição percentual das infecções pela cepa epidêmica durante o surto

Dentre todos os pacientes estudados, três foram a óbito, sendo dois no período do surto e um no pós-surto. As causas de óbito foram relacionadas a prematuridade, baixo peso e má formação congênita. Apenas um caso (Tabela 01, paciente 1) apresentou evidências, não comprovadas, de correlação com a infecção por *K. pneumoniae*.

5.5.2 A distribuição dos casos nos períodos do estudo

A frequência de isolamento de *K. pneumoniae* durante os três anos de observação definiram os três períodos classificados. A Figura 14 ilustra o tempo de internação de todos os pacientes que tiveram o isolamento da cepa epidêmica, totalizando 31 recém natos no período epidêmico, um no pré-epidêmico (abril de 2001) e três no pós-epidêmico (01 em fevereiro, 01 em março e outro em dezembro de 2002). Os pacientes estão agrupados em ordem cronológica de internação segundo a clínica de entrada na UN (UTI-Neo ou UCI).

A definição de infecção ou colonização deu-se em conjunto com informações da evolução clínica registrada em prontuário médico. Nas situações onde mais de uma colonização ou infecção foram evidenciadas no mesmo dia, apenas o primeiro evento foi registrado, com preferência para a representação dos eventos infecciosos.

Alguns pacientes merecem destaque. O paciente 10 teve alta em 24 de setembro, após 32 dias de internação devido a alterações congênitas do trato urinário e no quinquagésimo dia após a alta hospitalar retornou ao pronto-socorro do HURNP com queixas de infecção urinária. Nesta ocasião recuperou-se uma cepa de *K. pneumoniae* ESBL, posteriormente genotipada e definida como geneticamente relacionada à cepa epidêmica.

O paciente JF, identificado na figura 14 com o sinal “#”, foi internado por prematuridade, baixo peso (765 gramas) bolsa rota maior que 48 horas e gemelaridade. Sua internação na UN totalizou 191 dias, de 30 de setembro de 2001 a 26 de março de 2002. Neste período passou por inúmeros procedimentos invasivos, como nutrição parenteral (16 dias),

manutenção de sonda orogástrica (191 dias), transfusão de hemoderivados (por 11 vezes), ventilação mecânica (97 dias), acesso venoso (94 dias), uso de corticóides (30 dias) e uso de diversos antimicrobianos, dentre eles vancomicina (37 dias), meronem (26 dias) e imipenem (27 dias). Deste paciente, diversos materiais clínicos foram obtidos com o propósito de vigilância e diagnóstico, incluindo culturas de secreção de orofaringe (n=16), material nasal (n=3), secreção retroauricular (n=1), secreção gástrica (n=1), material retal (n=1), secreção ocular (n=1), sangue (n=5), líquido (n=3) e urina (n=1). De modo interessante, nenhuma cultura foi positiva para *Klebsiella* spp. Por outro lado, seu irmão, paciente 24 Tabela 01a (segundo gemelar), teve uma infecção urinária pela cepa epidêmica no vigésimo terceiro dia de internação e mais uma cultura de secreção de orofaringe positiva para o mesmo microrganismo 14 dias depois.

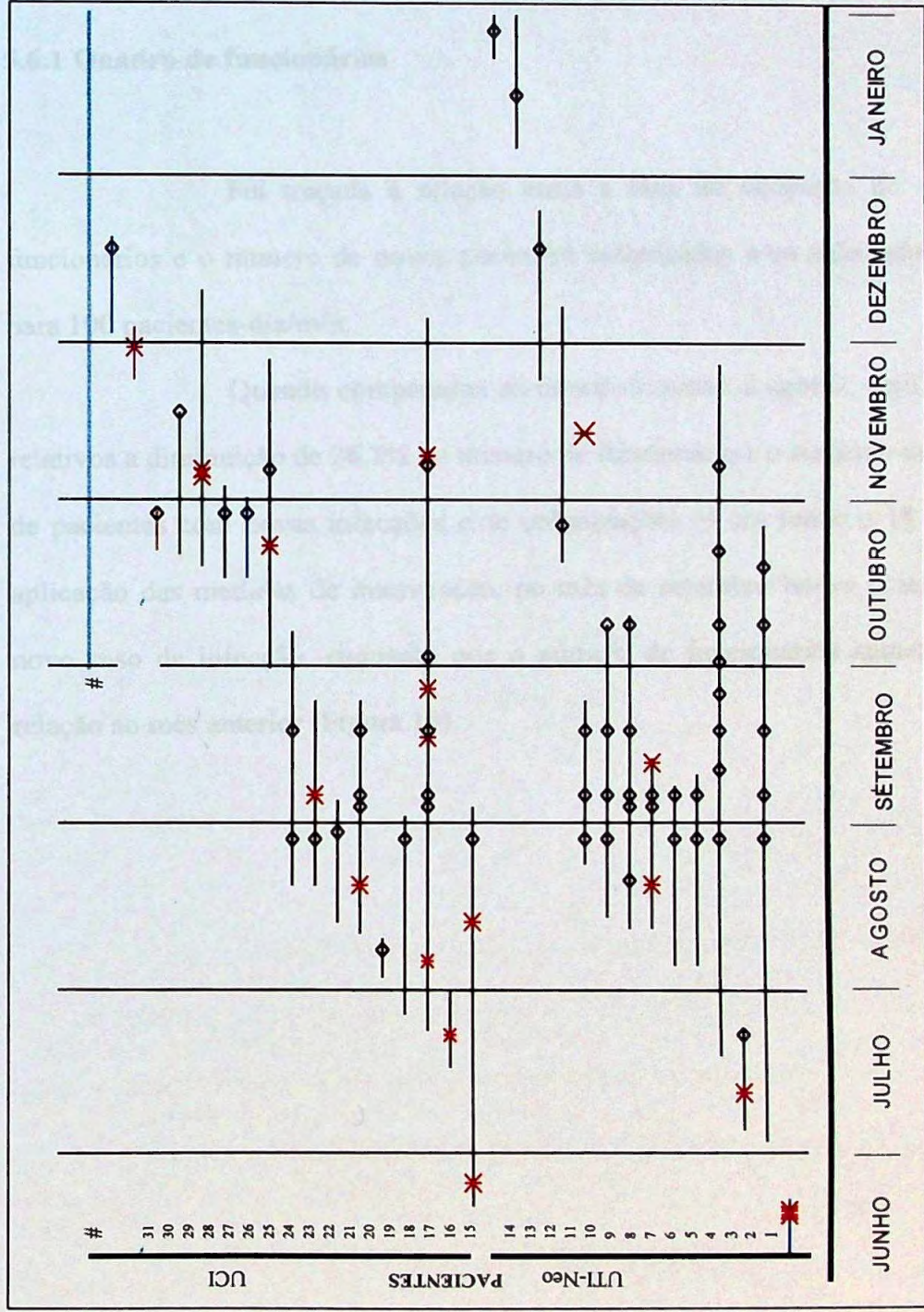


Figura 14- Isolamento da cepa epidêmica em sítios infectados ou colonizados de pacientes das clínicas UTI-Neo e UCI, no decorrer do período de internação, de junho de 2001 a janeiro de 2002

* Indica o isolamento da cepa epidêmica em sítio infectado

o Indica o isolamento da cepa epidêmica em sítio colonizado

JF, paciente internado durante 191 dias que não teve o isolamento da cepa epidêmica em nenhuma amostra, gêmeo do paciente 24

5.6 População do Estudo

5.6.1 Quadro de funcionários

Foi traçada a relação entre a taxa de ocupação do setor, o número de funcionários e o número de novos pacientes colonizados e/ou infectados, ambos corrigidos para 100 pacientes-dia/mês.

Quando comparados os meses de junho e agosto, verificou-se em números relativos a diminuição de 26,7% no número de funcionário e o aumento de 77,78% no número de pacientes com novas infecções e/ou colonizações (4 em junho e 18 em agosto). Após a aplicação das medidas de intervenção, no mês de setembro houve o registro de apenas um novo caso de infecção, enquanto que o número de funcionários aumentou em 39,8 % em relação ao mês anterior (Figura 15).

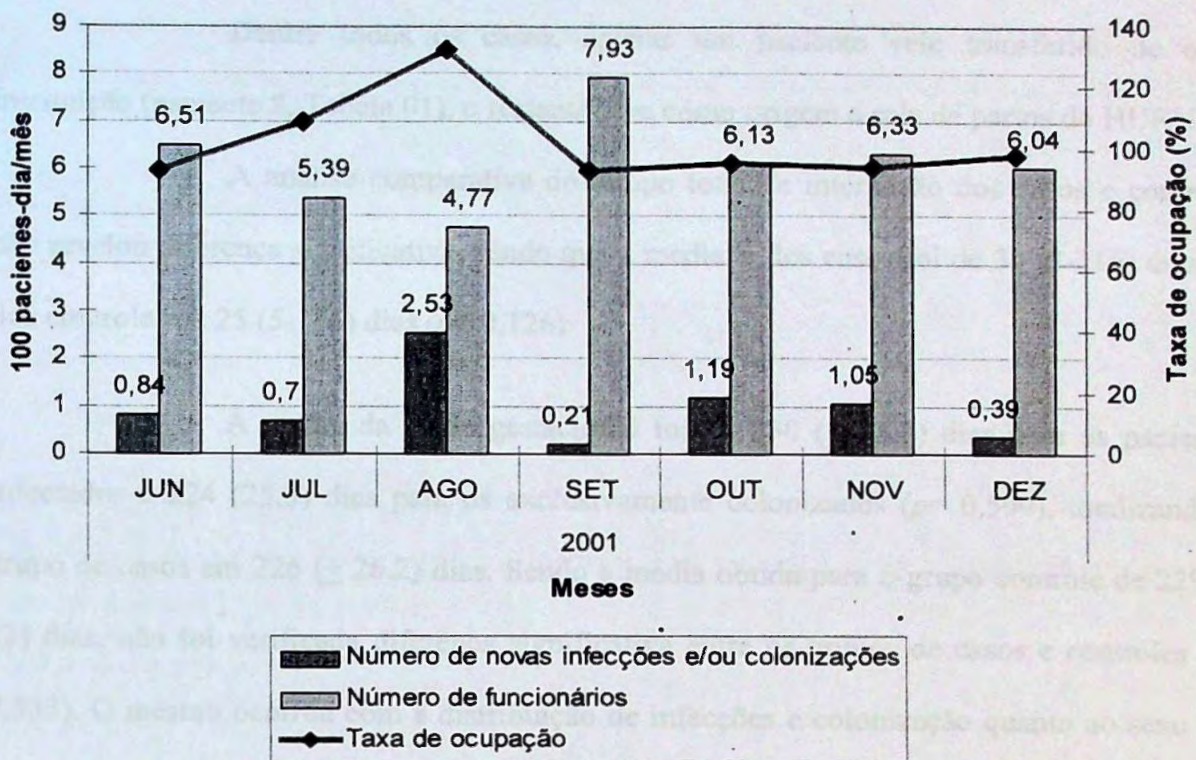


Figura 15- Relação entre o número de pacientes com novas infecções e/ou colonizações, a equipe de enfermagem e a taxa de ocupação da UN no período de junho a dezembro de 2001
Fonte: Divisão de Recursos Humanos e Divisão de Arquivo Médico do HURNP

5.6.2. Pacientes

Durante os três anos de acompanhamento deste estudo, deram entrada na UN do HURNP 1.231 pacientes, destes, 67 ficaram internados por um período inferior a 24 horas e foram excluídos, restando para a análise 1.164 pacientes.

Considerando apenas o período do surto, foram internados 230 recém natos que após a exclusão de 12 casos (internação <24 horas), totalizaram 218 pacientes definidos como a população exposta. Dentre os expostos no período, 31 apresentaram cultura positiva para *K. pneumoniae* ESBL (31 em 218, incidência acumulativa de 14,22%), sendo contabilizados 11 pacientes infectados (5 %) e 20 exclusivamente colonizados (9,1%). Ao considerar apenas os pacientes colonizados no período do surto como população exposta para o evento infecção a incidência cumulativa alcançou 35,5% (11 em 31).

Dentre todos os casos, apenas um paciente veio transferido de outra instituição (paciente 8, Tabela 01), o restante teve como origem a sala de partos do HURNP.

A análise comparativa do tempo total de internação dos casos e controles não revelou diferença significativa, sendo que a mediana dos casos foi de 34 (8-116) dias e a dos controles de 25 (5-176) dias ($p= 0,126$).

A média da idade gestacional foi de 230 ($\pm 28,4$) dias para os pacientes infectados e 224 (25,3) dias para os exclusivamente colonizados ($p= 0,509$), totalizando o grupo de casos em 226 ($\pm 26,2$) dias. Sendo a média obtida para o grupo controle de 229 (± 23) dias, não foi verificada diferença significativa entre os grupos de casos e controles ($p= 0,553$). O mesmo ocorreu com a distribuição de infecções e colonização quanto ao sexo ($p= 0,580$). A análise do peso ao nascer para o grupo de casos teve como mediana 1580 (530-4280) gramas e para os controles 1655 (680-2900) gramas, não havendo diferença significativa ($p=0,774$), ainda que estratificado e comparado como > 1500 gramas ($p=1$) ou ≤ 1500 gramas, ($p=1$); bem como para o índice de Apgar menor que 7 no quinto minuto para casos e controles ($p= 0,363$).

O tempo de internação até o primeiro isolamento da cepa epidêmica nos pacientes infectados teve uma mediana de 9 (4-23) dias e nos colonizado de 15,5 (5-57) dias ($p= 0,080$). Quando analisado o tempo de internação dos casos (infectados mais colonizados) até a primeira cultura positiva frente ao tempo de internação dos controles a mediana foi de 13 (4-57) dias e 25 (5-176) dias, respectivamente, passando a apresentar uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Tabela 02)

Tabela 02- Características dos pacientes definidos como casos (infectados e colonizados) e controles

Característica	Casos (Infectados e colonizados) n= 31	Controles N= 52	P
Tempo total de internação (dias) ^a	34 (8-116)	25 (5-176)	0,126 ^e
Idade gestacional (dias) ^b	226 (\pm 26,2)	229 (\pm 23)	0,553 ^c
Sexo			
Masculino	20	29	0,580 ^d
Feminino	11	23	
Peso ao nascer (gramas) ^a	1580 (530-4280)	1655 (680-2900)	0,774 ^e
> 1500 g	19	31	1 ^d
≤ 1500 g	12	21	1 ^d
Apgar 5 minutos <7	1	6	0,363 ^d
Tempo de internação em dias ^a (até a primeira cultura positiva para casos e internação total para controles)	13 (4-57)	25 (5-176)	< 0,001 ^e

^a expresso em mediana (mínimo-máximo)

^b expresso em média (\pm desvio padrão)

^c Teste t não pareado

^d teste do Qui-quadrado

^e Teste de Mann-Whitney

^f OR, *Odds Ratio* (razão de chances)

5.6.2.1 Associação entre procedimentos e infecção ou colonização

Três modelos de estudo foram desenvolvidos para a análise dos fatores associados. O primeiro considerou os procedimentos realizados somente até a data da primeira cultura positiva para a cepa epidêmica no grupo de casos e todo o período de internação dos controles. O segundo modelo considerou todo o tempo de internação dos casos e dos controles. O terceiro modelo avaliou os casos até a primeira cultura positiva e os controles apenas até o 16^o dia de internação. Este ponto de corte foi estabelecido com base na mediana do número de dias até a data da primeira cultura positiva dos colonizados de 15,5 dias (5-57) (PESSOA-SILVA et al, 2003).

Dentre estes três modelos de análise para os possíveis fatores associados, apenas no segundo verificou-se significado estatístico com o desenvolvimento de colonização e/ou infecção.

Foi possível estabelecer a associação entre a transfusão de hemocomponentes e o desenvolvimento de infecção pela cepa epidêmica ($p < 0,05$), entretanto tal associação não foi observada para os pacientes exclusivamente colonizados ($p = 0,388$). O tempo de uso de sonda para nutrição parenteral não pode ser associado isoladamente ao desenvolvimento de infecção ($p = 0,105$) ou colonização exclusiva ($p = 0,129$), porém a análise conjunta dos casos (infectados mais colonizados) frente aos controles tornou a associação significativa ($p < 0,05$). A duração do uso de cateteres venosos (centrais e/ou periféricos) pode ser relacionada com a infecção pela cepa epidêmica ($p < 0,005$) e também com a colonização exclusiva ($p < 0,05$) (Tabela 03).

A análise dos parâmetros estudados não definiu nenhuma associação estatisticamente significativa entre pacientes infectados e exclusivamente colonizados.

Tabela 03- Análise do tempo de exposição (dias) a fatores associados e a aquisição da cepa epidêmica na forma de colonização ou infecção

Procedimentos ^a	Infectados (N= 11)	Colonizados (N=20)	Casos (N=31)	Controle (N=52)	P ^b (Infectado x controle)	P (Colonizado x controle)	P (Casos x controle)
Transfusão	1 (0-3)	0 (0-6)	0 (0-6)	0 (0-11)	<0,05*	0,388	0,060
Nutrição parenteral	5 (0-15)	6,5 (0-16)	6 (0-16)	3 (0-22)	0,105	0,128	<0,05*
Cateter venoso	8 (3-18)	11 (4-40)	9 (3-40)	9 (0-94)	<0,005*	<0,05*	<0,005*
Uso sonda oro/nasogástrica	8 (0-22)	9 (0-57)	9 (0-57)	1,5(0-176)	0,402	0,839	0,549
Ventilação mecânica	0 (0-8)	0,5 (0-33)	0 (0-33)	0 (0-97)	0,680	0,360	0,372
CPAP	1 (0-10)	0,5 (0-11)	1 (0-11)	0 (0-10)	0,297	0,375	0,227

^a Os valores estão expressos em mediana (mínimo-máximo)

^b Teste de Mann-Whitney

* resultados estatisticamente significativos

5.6.2.2 Consumo de antimicrobianos

A análise do consumo isolado de antimicrobianos entre casos e controles não revelou associação com infecção ou colonização em nenhum dos três modelos epidemiológicos analisados. O mesmo foi observado para o uso combinado de algumas classes de antimicrobianos, como ilustram as Tabelas 4 e 5.

Tabela 04- Análise comparativa entre casos e controles quanto ao uso de diferentes antimicrobianos por períodos maiores ou iguais a 48 horas

Antimicrobiano	Casos (n=31) ^a	Controles (n=52)	P ^b
Amicacina	14	19	0,580
Gentamicina	23	31	0,267
Penicilina	9	16	1
Ampicilina	20	23	0,118
Cefepime	3	8	0,684
Carbapenêmicos	3	3	0,852
Vancomicina	5	13	0,843

^a Casos computados até a primeira cultura positiva e controles computados até o 16º dia de internação

^b teste do Qui-quadrado

Tabela 05- Análise comparativa entre casos e controles quanto ao uso combinado de diferentes antimicrobianos por períodos maiores ou iguais a 48 horas

Antimicrobiano	Casos (n=31)	Controles (n=52)	P ^a
Ampicilina/Penicilina + Aminoglicosídeo	27 ^a	39	0,298
Vancomicina + Aminoglicosídeo	3	10	0,397
Cefalosporina de terceira geração + Aminoglicosídeo	3	1	0,286
Cefalosporina de terceira geração + Vancomicina	1	1	1
Carbapenem + Aminoglicosídeo	1	1	1
Carbapenem + Vancomicina	1	1	1

^a teste do Qui-quadrado

5.7 Medidas de Intervenção

As medidas de intervenção foram implantadas assim que se definiu a ocorrência do surto, em 27 de agosto de 2001. O resultado obtido foi o aumento da adesão às precauções de contato e a erradicação da cepa epidêmica da UN.

5.8 Avaliação de procedimentos

A adesão às medidas de intervenção não foi auditada através de procedimentos padronizados, mas pelo contato freqüente com a equipe da unidade.

Foi mensurado o consumo de álcool 70° e de sabonete líquido degermante pela UN (com triclosan 2% ou clorhexidina 4%) em litros por 100 pacientes-dia/mês. Embora os resultados tenham demonstrado o aumento no consumo destes produtos no período pré-surto e diminuição durante o período do surto, houve um viés importante no registro destes dados, impossibilitando qualquer análise de resultados.

5.9 Investigação Microbiológica

5.9.1 Controles microbiológicos

Durante o estudo, todos os controles microbiológicos realizados de rotina pelo Laboratório de Microbiologia do Serviço de Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar apresentaram resultados satisfatórios. Em nenhum momento houve o isolamento de *K. pneumoniae* nas amostras de água potável, água de hemodiálise, nutrição enteral, leite materno, nutrição parenteral e hemoderivados.

5.9.2 Coleta de materiais

Especificamente para a investigação do surto, foram colhidas 314 culturas adicionais, envolvendo diversos materiais.

5.9.2.1 Materiais clínicos

Os materiais obtidos dos pacientes no período relacionado à investigação do surto foram: secreção de orofaringe, sangue, secreção de fossas nasais, liquor, urina, ponta de cateter, exsudatos cutâneos, secreção conjuntival e cultura de material retal.

5.9.2.2 Coleta das equipes de atendimento

Foram colhidas culturas de 31 funcionários no decorrer das investigações, distribuídos em todos os turnos. A média mensal neste período foi de aproximadamente 37 funcionários.

Dentre as culturas de pessoal, as mãos de duas auxiliares de enfermagem foram positivas para *K. pneumoniae* multirresistente ESBL, denominadas como Auxiliar C e Auxiliar S.

a) Culturas da Auxiliar C

A primeira coleta das mãos foi realizada em 14 de setembro de 2001, resultando em cultura negativa para *K. pneumoniae*. Na semana seguinte, em 21 de setembro, foi repetida a coleta e desta vez o resultado foi positivo para a cepa investigada.

Concluída a cultura, a auxiliar foi prontamente transferida para a Unidade de Maternidade do HURNP e orientada a trabalhar sempre com as mãos enluvadas, tendo permanecido na UN com as mãos colonizadas no período estimado entre 15 e 25 de setembro.

Ao exame clínico, as mãos mostravam-se sem alterações cutâneas ou ungueais evidentes. Em 30 de setembro novas culturas foram colhidas de sítios potencialmente colonizados por *K. pneumoniae*, como: cultura axilar, inguinal, retal, vaginal, nasal, de conduto auditivo, do couro cabeludo e de orofaringe, além de coprocultura. Estas culturas foram repetidas por mais duas vezes, sempre com ausência de *K. pneumoniae*, inclusive nas amostras de fezes e na cultura retal.

A colonização das mãos manteve-se presente por um período maior que 90 dias, mesmo após anti-sepsia com álcool 70°, povidine degermante, hipoclorito ou sabonete líquido com clorhexidine.

Em 19 de outubro de 2001, as mãos da Auxiliar C foram cultivadas separadamente e observou-se que apenas a mão direita mantinha a colonização, enquanto as culturas da mão esquerda eram negativas para *K. pneumoniae*. Em 28 de outubro novas culturas comprovaram a colonização especificamente da mão direita, resultados que se repetiram em coletas realizadas em 1 e 19 de novembro. Em 4 de janeiro de 2002 a coleta das mãos foi direcionada para três diferentes pontos: unhas, palma das mãos e dorso das mãos. Nesta data, o uso freqüente de luvas e a higienização constante das mãos tornou evidente a manifestação clínica de uma onicomicose em dedo médio da mão direita, com discreta paroníquia. O resultado das culturas foi positivo para a cepa epidêmica apenas neste dedo. À pesquisa direta, foram também observadas leveduras com filamentos pseudomicelares que cresceram em cultura no Agar Sabouraud (Oxoid, Inglaterra) e foram identificadas como *Cândida albicans*. Prontamente, o SPCIH encaminhou a funcionária ao serviço de Medicina do Trabalho e à Dermatologia, para dar início ao tratamento antifúngico adequado.

Em 18 de fevereiro de 2002, após um mês de terapia antifúngica, novas culturas foram negativas para *K. pneumoniae* e permaneceram inalteradas até 14 de março de 2002, quando a pesquisa e a cultura para fungos também foram negativas.

No dia 11 de março a Auxiliar C voltou à escala de pessoal da UN, época na qual estava internado o paciente 14 (Tabela 01), com culturas positivas para a cepa epidêmica em trato respiratório em 06 de março e 20 de março de 2002. Orientada a trabalhar de luvas, não apresentou mais cultura positiva para *Cândida albicans* nem para *K. pneumoniae* ESBL.

b) Culturas da Auxiliar S

Em 29 de novembro de 2001 foi detectada a segunda auxiliar com cultura positiva para a cepa epidêmica. Após o resultado da primeira cultura, em 05 de dezembro a funcionária voltou para nova coleta das mãos e de raspado axilar, inguinal, retal, vaginal, nasal, de conduto auditivo, do couro cabeludo, de orofaringe e fezes. Todas as culturas foram negativas para *K. pneumoniae* ESBL e nenhuma alteração foi observada nas mãos e unhas.

Enquanto aguardava os resultados, a Auxiliar S foi orientada a manter o uso de luvas em tempo integral, não sendo afastada da UN.

5.9.2.3 Coletas do Ambiente

Foram colhidas 29 culturas do ambiente da UN que evidenciaram a disseminação da cepa epidêmica pela unidade. As culturas incluíram superfícies de incubadoras, estetoscópios, esfigmomanômetros, pranchetas, superfície de equipamentos, superfície de mobiliários, pias e torneiras. Em cinco de setembro de 2001 foram isoladas

cepas de *K. pneumoniae* ESBL na porta da incubadora de dois recém natos colonizados (paciente 4 e paciente 9, Tabela 01)

5.9.3 Cepas selecionadas para a feno e a genotipagem

A análise de todas as culturas colhidas no período (vigilância e diagnóstico), resultou na seleção aleatória de 73 isolados de *K. pneumoniae* representativos dos pacientes infectados, colonizados, funcionários e ambiente. As cepas foram classificadas segundo os períodos definidos para o estudo e a origem de sítio infectado ou colonizado. Um paciente apresentou infecção urinária após 50 dias de alta da UN e foi definido como “Infecção pós-alta”. Foram incluídas também as culturas positivas de ambiente e das mãos das auxiliares de enfermagem colonizadas. No período do surto foram obtidas seis cepas não produtoras de ESBL na UN, duas de infecção (3125, hemocultura e 2637, infecção urinária) e quatro de colonização (3958, 3956, 6020 e 5039) inicialmente definidas respectivamente como “Infecção endêmica” e “Colonização endêmica” por se diferenciarem das epidêmicas. As cepas “epidemiologicamente não relacionadas” foram isoladas de pacientes internados em outras unidades do hospital. Foram incluídos ainda, isolados de pacientes internados na UTI-Neo do Hospital Evangélico de Londrina (HEL) e duas cepas causadoras de um surto na mesma UN do HURNP em 1999 (Tabela 06).

Tabela 06- Definição da representatividade epidemiológica das cepas tipadas, segundo a relação geográfica e temporal

Origem das cepas	Período
Sítio infectado (n= 13)	Surto
Sítio colonizado (n= 23)	Surto
Ambiente (n= 02)	Surto
Mãos da auxiliar de enfermagem "C" (n= 12)	Surto e pós-surto
Mãos da auxiliar de enfermagem "S" (n= 01)	Surto
Sítio infectado (não ESBL) (n= 01)	Surto
Sítio colonizado (não ESBL) (n= 04)	Surto
Outros setores do hospital (ESBL) (n= 10)	Surto (controle)
UTI-Neo do Hospital Evangélico (ESBL) (n= 05)*	Surto*(controle)
Surto documentado em 1999 (n= 02)	1999 (controle)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 1383 (n= 01)	Controle
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (n= 01)	Controle
<i>K. pneumoniae</i> SHV-18 (ICARE)** (n= 01)	Controle
<i>K. pneumoniae</i> (Itapecirica da Serra) (n= 01)	Controle

*Hospital Evangélico de Londrina

***Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*

As cepas controle de *K. pneumoniae* ATCC1383 e *E. coli* ATCC25922, bem como as outras previamente tipadas em diferentes estudos: uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de SHV-18, do programa *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology* (ICARE) e uma *K. pneumoniae* ESBL causadora de surto na UTI-Neo do Hospital Geral de Itapecirica da Serra, São Paulo, apresentaram perfis próprios, geneticamente não relacionados entre si e nem com as cepas do surto (Tabela 07).

Tabela 07- Isolados clínicos de colonização ou infecção selecionados para a análise fenotípica e genotípica (n=73)

Classificação	Número	Período	Material	Produção de ESBL
COLONIZAÇÃO, PERÍODO DO SURTO (n=23)	2643	29.08.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	2651	29.08.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	2740	06.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	2745	06.09.01	Sç.nasal	ESBL +
	2888	11.09.01	Sç. nasal	ESBL +
	2889	11.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	2989	18.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	3268	02.10.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	3463	22.10.01	Sç.nasal	ESBL +
	3615	07.11.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	2738-1	06.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +

	3218-2		25.09.01	Axilar/Inguinal	ESBL +
	3240-a		01.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL +
	3240-b		01.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL +
	3240-d		01.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL +
	3330-2		08.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL +
	3462-1		22.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL +
	3462-3		22.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL +
	3598-1		06.11.01	Sç. Orofaringe	ESBL +
	3958		18.12.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	3956		18.12.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	6020		28.01.02	Sç. orofaringe	ESBL +
	5039-2		16.01.02	Material retal	ESBL +
INFECÇÃO, PERÍODO DO SURTO (n= 13)	1339		23.07.01	Sç. ocular	ESBL +
	2637		13.08.01	Urina	ESBL -
	3099		20.08.01	Urina	ESBL +
	3112		20.08.01	Urina	ESBL +
	3125		20.08.01	Sangue	ESBL -
	3127		20.08.01	Sç.ocular	ESBL +
	5102		12.09.01	Urina	ESBL +
	5645		26.09.01	Urina	ESBL +
	6354		23.10.01	Sç.ocular	ESBL +
	6691		05.11.01	Urina	ESBL +
	6694		05.11.01	Cateter	ESBL +
	6822		09.11.01	Sç.ocular	ESBL +
	6966		17.11.01	Urina	ESBL +
INFECÇÃO PÓS-ALTA (n=1)	6878		13.11.01	Urina	ESBL +
AMBIENTE (n=2)	2784		15.09.01	Porta incubadora	ESBL +
	2787		15.09.01	Porta incubadora	ESBL +
MÃOS (n=13)	3128 "S"		21.09.01	Mãos	ESBL +
	3205 "S"		25.09.01	Mãos	ESBL +
	3258 "S"		01.10.01	Mãos	ESBL +
	3259 "S"		01.10.01	Mãos	ESBL +
	3440 "S"		19.10.01	Mãos	ESBL +
	3442 "S"		19.10.01	Mãos	ESBL +
	3444 "S"		19.10.01	Mãos	ESBL +
	3496 "S"		19.10.01	Mãos	ESBL +
	3498 "S"		28.10.01	Mãos	ESBL +
	3578 "S"		01.11.01	Mãos	ESBL +
	3580 "S"		01.11.01	Mãos	ESBL +
	3746 "C"		29.11.01	Mãos	ESBL +
	3918 "S"		12.12.01	Mãos	ESBL +
COLONIZAÇÃO, ENDÊMICA (n=4)	3525		29.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL -
	3533		29.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL -
	3534		29.10.01	Sç. nasal	ESBL -
	3539-1		29.10.01	Sç. Orofaringe	ESBL -
CEPAS EPIDEMIOLOGICAMENTE NÃO RELACIONADAS (n=10)	147	Enf.Masc.	03.07.01	Liq. Peritoneal	ESBL +
	2576	UTI	11.03.02	Sangue	ESBL +
	2996	Enf.Masc.	19.03.02	Sangue	ESBL +
	3088	Pediatria	20.03.02	Secreção	ESBL +
	3413	Enf.Femin.	23.08.01	Urina	ESBL +

	3667	Pediatria	28.08.02	Sangue	ESBL +
	5955	Enf.Femin.	08.10.01	Sangue	ESBL +
	6237	Enf.Masc.	19.10.01	Sç. Pele	ESBL +
	6672	Pediatria	05.11.01	Urina	ESBL +
	8041	Enf.Masc.	17.06.02	Urina	ESBL +
HOSPITAL	3087		21.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +
EVANGÉLICO (n=5)	3089-1		21.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	3089-2		21.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	3097		21.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +
	3101		21.09.01	Sç. orofaringe	ESBL +
SURTO HU, 1999 (n=2)	K. atip 03		1999	Sç. orofaringe	ESBL +
	K. atip 04		1999	Sç. orofaringe	ESBL +

5.9.4 Teste de Sensibilidade e detecção de ESBL

As Tabelas 8 e 8a trazem os resultados de sensibilidade e de detecção de ESBL em cinco cepas representativas do surto e dois controles. Estão representadas sete cepas provenientes de diferentes fontes e períodos, incluindo: uma infecciosa de julho de 2001 (1339); colonizante de outubro – resistente aos carbapenêmicos - (3463); colonizante de novembro (3615); ambiente de outubro (2784); colonização das mãos da auxiliar de enfermagem “C” de setembro (3205); infecciosa de agosto de 2001 – isolada na pediatria - (3667) e de uma colonização registrada em outubro no HEL (3087).

Todos os isolados epidemiologicamente relacionados, obtidos durante a investigação, foram positivos para as técnicas fenotípicas de detecção de ESBL, com exceção dos isolados: 2637, 3125, 3525, 3533, 3534 e 3539. Os isolados 2637 e 2643 foram obtidos de um mesmo paciente, em momentos e materiais distintos, e embora sejam discordantes quanto à produção de ESBL, foram definidas como geneticamente relacionadas pela PFGE.

Tabela 08- Perfil de sensibilidade da cepa epidêmica e de dois controles obtidos em diferentes situações

Antimicrobiano*	FONTE													
	Infecção (1339) paciente 16		Colonização (3463) paciente 4		Colonização (3615) paciente 4		Ambiente UN (2784) incubadora		Colonização (3205) mãos "C" ^a		Colonização (3667) HURNP ^b		Colonização (3087) HEL ^c	
	Halo (mm)	Interpretação	Halo	Interpretação	halo	Interpretação	halo	Interpretação	halo	Interpretação	halo	Interpretação	halo	Interpretação
Cefalotina	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Cefoxitina	20	S	0	R	20	S	19	S	19	S	19	S	19	S
Cefotaxima	0	R	0	R	11	R	11	R	0	R	10	R	11	R
Cefpodoxima	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Ceftadizidima	17	I	18	I	16	I	17	I	16	I	18	I	0	R
Ceftriaxona	10	R	11	R	11	R	9	R	10	R	9	R	12	R
Aztreonam	11	R	10	R	10	R	9	R	0	R	0	R	0	R
Cefepime	10	R	9	R	9	R	0	R	0	R	0	R	8	R
Ciproflox.	30	S	32	S	30	S	32	S	31	S	34	S	30	S
Amicacina	16	I	15	I	15	I	15	I	16	I	16	I	16	I
Gentamicina	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Imipenem	27	S	12	I	24	S	24	S	25	S	25	S	22	S
Meropenem	26	S	10	R	24	S	25	S	24	S	25	S	22	S
Ertapenem	22	S	0	R	23	S	22	S	24	S	25	S	22	S
Piperac./tazob	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	12	R	8	R
Sulfa./tmp	15	I	10	R	14	I	14	I	15	I	15	I	16	S

* Segundo NCCLS (2001)

^a mãos "C": cepa isolada nas mãos da auxiliar de enfermagem C em 25 de setembro de 2001^b HURNP: cepa isolada em hemocultura da pediatria em 28 de agosto de 2001, incluída como controle mas que apresentou o mesmo perfil de PFGE da cepa epidêmica^c HEL: cepa isolada em secreção de orofaringe da UTI-Neo do Hospital Evangélico de Londrina em 20 de outubro de 2001. Incluída como controle, mas que apresentou o mesmo perfil de PFGE da cepa epidêmica

Tabela 08a- Confirmação de ESBL em cinco cepas epidêmicas e dois controles

Antimicrobiano	FONTE																							
	Infecção (1339) paciente 16			Colonização (3463) paciente 4			Colonização (3615) paciente 4			Ambiente UN (2784) incubadora			Colonização (3205) mãos "C" ^c			Colonização (3667) HURNP ^b			Colonização (3087) HEL ^b					
	Etest ESBL	Discos combinados	DDS	Etest ESBL	Discos combinados	DDS	Etest ESBL	Discos combinados	DDS	Etest ESBL	Discos combinados	DDS	Etest ESBL	Discos combinados	DDS	Etest ESBL	Discos combinados	DDS	Etest ESBL	Discos combinados	DDS			
Cefotaxima CTX-Clav ^{**}		+	+		+	+		+	+		+	+		+	+		+	+		+	+			
Cefpodoxima CPD-Clav		+	+		+	-		+	+		+	-		+	+		+	-		+	-			
Ceftadizidima CAZ-clav	+	+	+	+	+	+		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Aztreonam			+			+			+			+			+			+			+			

* Segundo NCCLS (2001)

**Discos combinados (Oxoid): CTX-Clav, cefotaxima/ácido clavulânico; CPD-Clav, cefpodoxima/ácido clavulânico; CAZ-clav, ceftazidima/ácido clavulânico

^a mãos "C": cepa isolada nas mãos da auxiliar de enfermagem C em 25 de setembro de 2001

^b HURNP: cepa isolada em hemocultura da pediatria em 28 de agosto de 2001, incluída como controle mas apresentou o mesmo perfil de PFGE da cepa epidêmica

^c HEL; cepa isolada em secreção de orofaringe na UTI-Neo do HEL em 20 de outubro de 2001. Incluída como controle, mas apresentou o mesmo perfil de PFGE da cepa epidêmica

^d teste de discos combinados: +, teste positivo para ESBL; -, teste negativo para ESBL

5.9.4.1 *K. pneumoniae* com padrão de sensibilidade atípico

Dentre as cepas de *K. pneumoniae* isoladas do paciente 4 (tabela 01), foram recuperadas três com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos. Os níveis de resistência apresentaram um aumento gradativo conforme a cronologia das coletas e o maior tempo de uso de antimicrobianos, incluindo 40 dias de vancomicina, 27 dias de meropenem e 11 dias de imipenem (Figura 16). Inicialmente foi verificado o surgimento de resistência a cefoxitina, passando ao ertapenem, meropenem e, por fim, a resistência intermediária ao imipenem (CIM de 8 µg/mL) (Tabela 09).

Os achados foram confirmados em novos testes com os mesmos isolados, incluindo o uso de cepas ATCC de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *E. coli* (ATCC 25922).

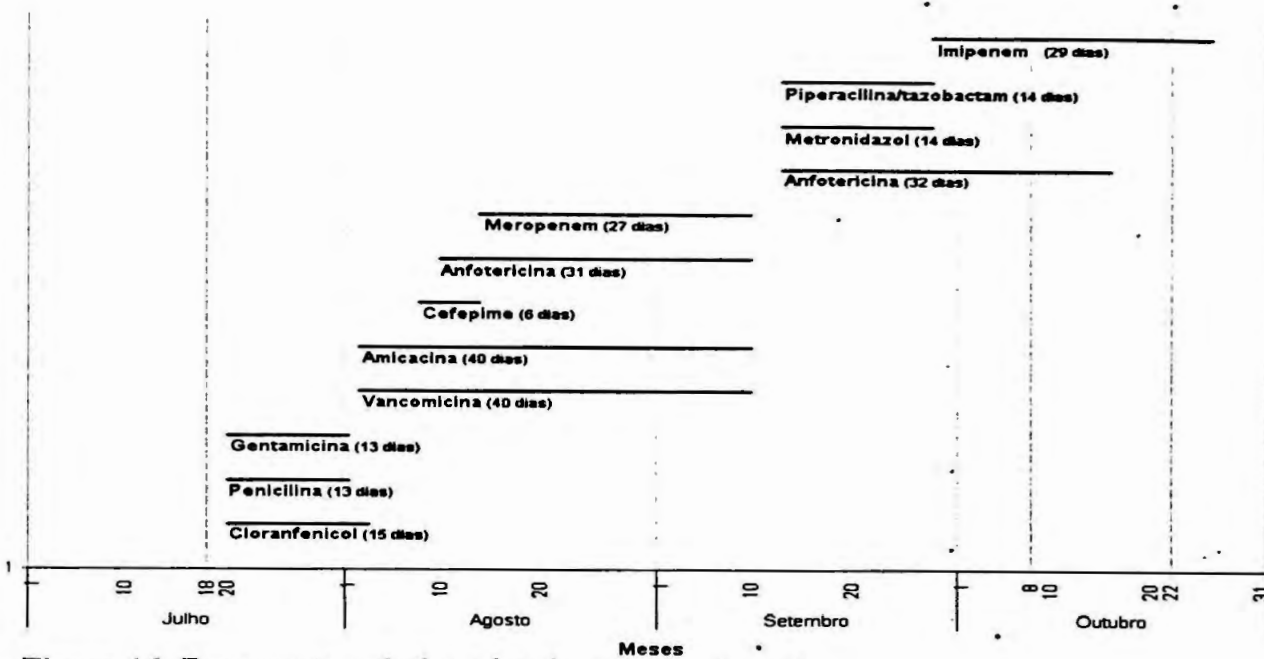


Figura 16- Esquema terapêutico adotado para o paciente 4.

^a Data de internação: 18 de julho de 2001

^b Isolamento das cepas resistentes aos carbapenêmicos: 8 e 22 de outubro de 2001

Resultados preliminares da determinação do perfil de proteínas de membrana externa revelaram a diminuição na expressão de uma proteína de 36 kDa (resultados ainda não publicados).

Tabela 09- Perfil de sensibilidade à cefoxitina e aos carbapenêmicos de isolados obtidos do paciente 4

Data coleta	Amostra	Cefoxitina (mm)	Ertapenem (mm)	Meropenem (CIM ^a)	Imipenem (mm)
29 AGO	2651	21 - S	23 - S	0,12 - S	22 - S
11 SET	2889	0 - R	11 - S	1,5 - S	22 - S
8 OUT	3330	10 - R	0 - R	12 - I	16 - S
22 OUT	3462/3463	10 - R	0 - R	16 - R	14 - I

^a Determinação da concentração inibitória mínima com Etest[®]

5.9.5. Tipagem

5.9.5.1 Biotipo das cepas epidêmicas

A biotipagem das cepas isoladas de sítios infectados, colonizados, ambiente e mãos da equipe da UN (n= 56) foi realizada através do sistema automatizado MicroScan^R e resultou no perfil de provas descrito no Quadro 04, gerando como número de biótipo o mesmo valor: 7774437-2. Neste grupo estão incluídos quatro isolados não produtores de ESBL.

Quadro 04- Resultado das provas metabólicas realizadas pelo sistema MicroScan^R

Provas	Resultados
Fermentação de açúcares: Glicose Sucrose Sorbitol Rafinose Inositol Raminose Arabinose Adonitol Melbiose	Todos os açúcares foram fermentados
Produção de uréase	Reação positiva
Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)	Reação negativa
Formação de indol	Reação negativa
Descarboxilação de aminoácidos: Lisina Arginina Ornitina	Reação positiva apenas para lisina
Desaminação de aminoácido: Triptofano	Reação negativa
Hidrolise da esculina	Reação positiva
Reação de VP (Voges-Proskauer)	Reação positiva
Galactosidade (ONPG)	Reação positiva

Utilização de carboidratos Citrate Malonate	Reação positiva
Tolerância antimicrobiana Colistina (CIM 14µg/mL) Cefalotina (CIM > 8µg/mL)	Resistente Resistente
Oxidase	Negativa

5.9.5.2 Antibiotipo das cepas epidêmicas

O perfil de sensibilidade das cepas geneticamente relacionadas apresentou pequenas variações quanto ao tamanho dos halos, ainda assim, a categoria de interpretação não foi alterada, sendo definido um padrão predominante. A exceção observada foi com o sulfametoxazol-trimetoprim, além de formar halos com algum crescimento interno (característico desta droga), houve variações na categoria de interpretação em 13 das 56 cepas testadas (23,2%). Outra alteração entre as cepas epidêmicas foi a emergência de resistência à cefoxitina (n=3; 5,2%) e aos carbapenêmicos (n=2; 3,5%). Os quatro isolados não produtores de ESBL apresentaram um perfil de múltipla sensibilidade e, dentre as drogas testadas, mantiveram a resistência apenas à ampicilina.

5.9.5.3 Perfil plasmidial das cepas epidêmicas

Foi estudado aleatoriamente o perfil plasmidial de 32 das 73 cepas selecionadas (43,8%), destas, 28 eram epidemiologicamente relacionadas. Foram definidos 5 padrões de bandas distintos, 18 (67,8%) apresentaram um padrão mais freqüente classificado como A, com dois plasmídios que migraram em 128 Mega Daltons (MDa) e 68 MDa. Ainda para as cepas epidêmicas, foram observados mais três perfis: B, com bandas em 68 e 54 MDa (n=6, 21,4%); C, com bandas em 98, 23 e 13 MDa (n=1, 3,5%) e F, com banda em 110 MDa

(n=3, 10,7%). O perfil C foi também obtido em cepas isoladas no Hospital Evangélico de Londrina (HEL) (n=2), enquanto que os perfis D (n=1) com bandas em 110, 36 e 12 MDa, e E (n=1) com bandas em 110, 79, 23 e 14 MDa foram exclusivos daquele hospital (Figuras 17 e 17a).

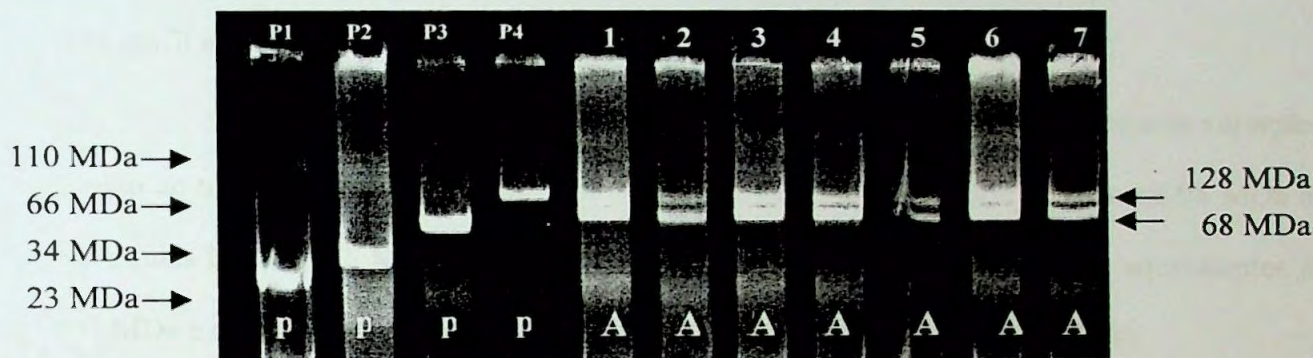


Figura 17- Perfil plasmidial de cepas provenientes de infecção e colonização

Origem: 1= 1339, paciente 16, conjuntivite (23.07.01); 2= 2636, paciente 18, orofaringe (29.08.01); 3= 2640, paciente 21, orofaringe (30.08.01); 4= 2643, paciente 15, orofaringe (29.08.01); 5= 2647, paciente 22, orofaringe (29.08.01); 6= 2651, paciente 4, orofaringe (29.08.02); 7= 2740, paciente 20, orofaringe (06.09.01)

p - padrão de peso molecular

A - perfil definido para as cepas teste

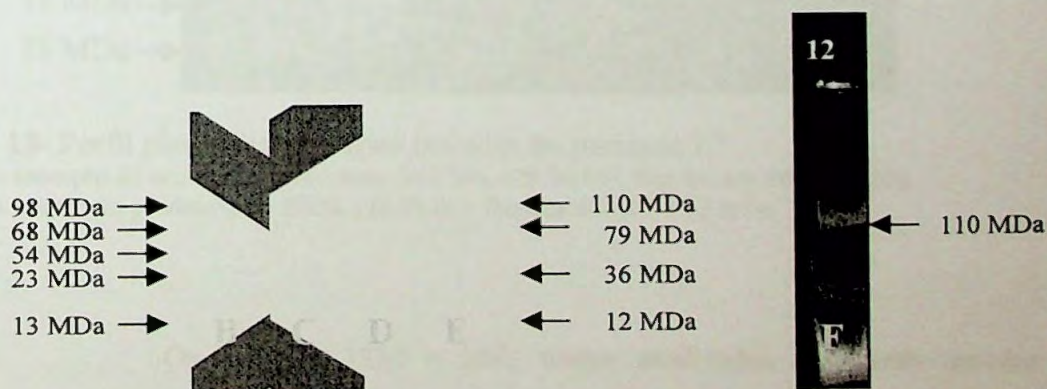


Figura 17a- Perfil plasmidial de cepas provenientes de infecção, ambiente, mãos e do HEL

Origem: 8= 2787, ambiente (15.09.01); 9= 3440, mãos da auxiliar de enfermagem (19.10.01), 10= 3089-2, HEL, orofaringe (01.10.01); 11= 3097, HEL, orofaringe (01.10.01) e 12= 6694, paciente 27, ponta de cateter (05.11.01)

B, C, D, E e F – perfis definidos para as cepas teste

Foi observado também o comportamento plasmidial de cepas que apresentaram características inusitadas quanto ao perfil de sensibilidade. Foram isoladas duas cepas em um mesmo paciente - com mesmo genótipo - e que apresentaram resultados discordantes quanto a produção de ESBL (2643 e 2637), além de cepas de *K. pneumoniae* com perfil atípico de resistência aos carbapenêmicos (3330 e 3462).

Entre os isolados 2643 e 2637 foi possível identificar uma pequena variação quanto ao tamanho dos plasmídios. O primeiro, apresentou uma banda pesada em 98 MDa e outra mais leve em 71 MDa, enquanto o segundo revelou bandas nas regiões equivalentes a 107 MDa e 63 MDa, coincidindo com a expressão do fenótipo ESBL (Figura 18).

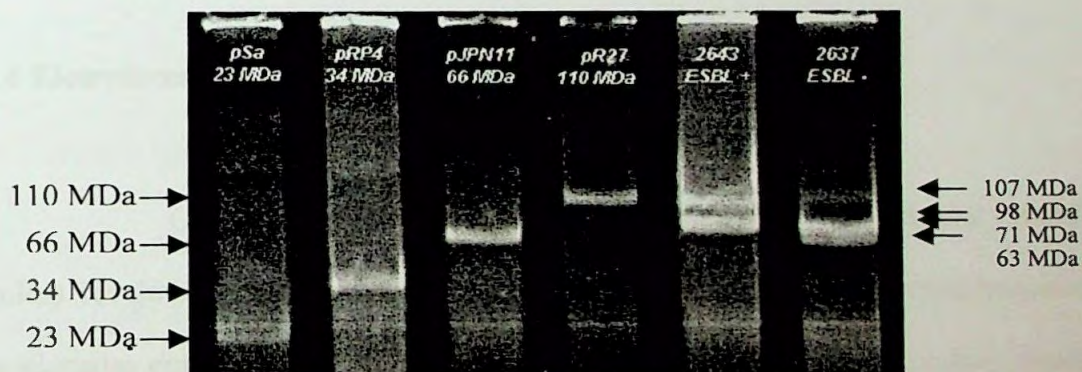


Figura 18- Perfil plasmidial de cepas isoladas do paciente 15

2643: em secreção de orofaringe, produtora de ESBL (29.08.01). Bandas em 98 e 71 MDa

2637: em urina, não produtora de ESBL (13.08.01). Bandas em 107 e 63 MDa

Os isolados 3330 e 3462 foram analisados comparativamente com duas outras cepas sensíveis aos carbapenêmicos, 2651 e 2889, obtidas do mesmo paciente, todas com mesmo genótipo. Foi observada a reprodutibilidade entre as cepas sensíveis, com duas bandas na região de 130 e 81 MDa, entre as resistentes foram definidas bandas características

de um grande plasmídio, com 150 MDa (Figura- 19). Ressaltando que todas mantiveram o fenótipo ESBL.



Figura 19- Perfil plasmidial de cepas isoladas do paciente 4
2651 e 2889 – sensíveis aos carbapenêmicos
3330 e 3462 – resistentes aos carbapenêmicos

5.9.5.4 Eletroforese em campo elétrico variável (PFGE)

O estudo da epidemiologia molecular das 77 cepas estudadas (incluindo os 4 controles) revelou 16 padrões distintos de macrorrestrição do DNA cromossômico. Todas foram alocadas em perfis denominados de perfil I a perfil XVI. Foram tipadas cepas obtidas no período de 23 de julho de 2001 a 16 de janeiro de 2002, incluindo cepas representativas de sítios infectados, colonizados, ambiente, mãos da equipe, controles de outros setores do hospital, de um surto contemporâneo ocorrido na UTI-Neo do HEL, outro documentado em 1999 na mesma UN do HURNP e de um terceiro ocorrido em Itapeirica da Serra, além de uma cepa do projeto ICARE e outra de *E. Coli* (Tabela 10).

Tabela 10- Classificação dos diferentes perfis gerados através da análise do polimorfismo do DNA cromossômico

Origem das cepas	Cepas testadas (n)	Perfil* (n)
Sítio infectado	11	I ^a (11)
Sítio infectado pós-alta	1	I (1)
Sítio colonizado	23	I (23)
Ambiente	02	I (02)
Mãos da auxiliar de enfermagem "C"	12	I (12)
Mãos da auxiliar de enfermagem "S"	01	I (1)
Sítio infectado (não ESBL)	02	I (1) ^b ; VIII(1)
Sítio colonizado (não ESBL)	04	III (3); VII (1)
Outros setores do hospital (ESBL)	10	I (2); IV (3); IX (1); X (1); XI(1); XII (1); XIII (1)
UTI-Neo do Hospital Evangélico (ESBL)	05	I (1); II (3); VI (1)
Surto documentado em 1999	02	V (2)
<i>K. pneumoniae</i> SHV-18 (ICARE)	01	XIV (1)
<i>K. pneumoniae</i> (Itapecirica da Serra)	01	XV (1)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	01	XI (1)

* A denominação dos perfis foi aleatória. Cada perfil representa microrganismos agrupados com base na interpretação das bandas geradas

^a O perfil "I" define a cepa epidêmica

^b A tipagem desta cepa foi confirmada na mesma amostra e também em nova amostra estocada a -70°C

As cepas produtoras de ESBL obtidas de sítios infectados apresentaram um único perfil, denominado como perfil I. Dentre estas, 11 foram colhidas durante o período do surto e uma foi recuperada de uma infecção urinária 50 dias após o paciente ter recebido alta da UN (Sítio infectado pós-alta). Em hemocultura obtida do paciente 20, em 20 de agosto de 2001, foi recuperada uma cepa não produtora de ESBL, definida como perfil VIII. Ainda no mesmo dia, foram colhidas culturas de urina e cateter, ambas com isolados produtores de ESBL classificados como perfil I. O segundo isolado do período do surto não produtor de ESBL foi o 2637, embora tenha sido classificado também como perfil I.

As amostras representativas de sítios colonizados, produtoras de ESBL, obtidas no período do surto, foram todas classificadas como sendo da linhagem epidêmica (perfil I), o mesmo para os isolados de ambiente e mãos das auxiliares de enfermagem. As colonizadoras não produtoras de ESBL, colhidas no mesmo período, foram classificadas em dois perfis distintos, sendo três do perfil III e uma do perfil VII.

Os isolados testados de *K. pneumoniae* ESBL obtidos de pacientes internados em outros setores do hospital foram classificados em sete diferentes perfis, onde se verificou a presença do perfil epidêmico também fora da UN - na Pediatria - em 20 de março de 2002 (3088) e 28 de agosto de 2002 (3667). Também foi possível observar a existência de uma cepa disseminada por diferentes enfermarias e na UTI de pacientes adultos, definida como perfil VI.

As *K. pneumoniae* ESBL colhidas na UTI-Neo do HEL foram classificadas em três perfis, sendo que um deles foi coincidente com o perfil I da cepa epidêmica da UN do HURNP.

Os dois isolados de *K. pneumoniae* ESBL representativos do surto ocorrido em 1999 na mesma UN foram definidos perfil V (Tabela 11).

A montagem do dendrograma foi feita com 43 cepas representativas, destas, 23 foram agrupadas com similaridade superior a 85% pelo coeficiente de Dice (Figura 20).

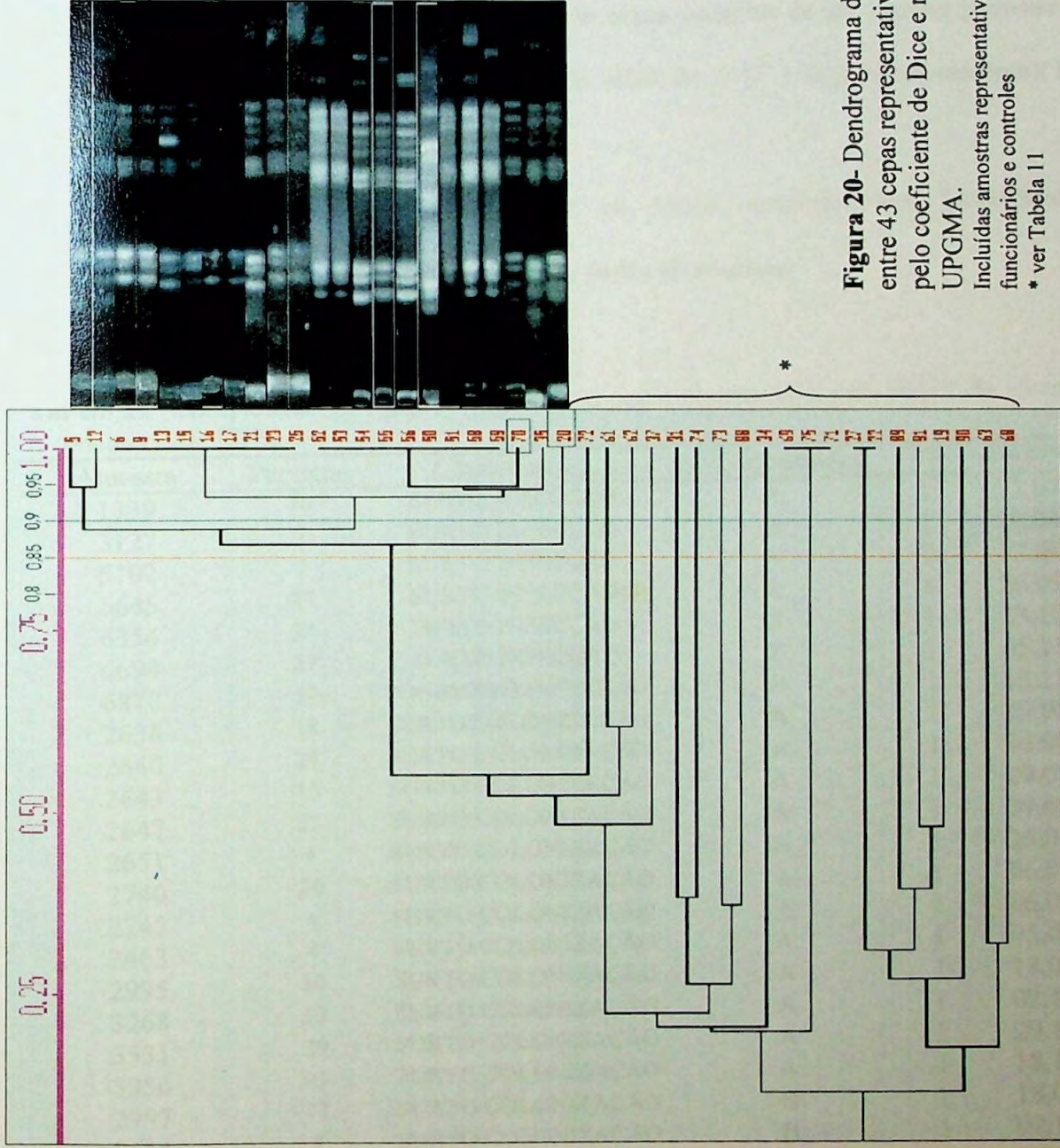
Tabela 11- Classificação das cepas tipadas pela PFGE segundo o perfil obtido

Perfil	Representatividade epidemiológica ^a	Data de coleta	Material	Enfermaria	Número no gel de agarose (PFGE)	Número da cultura
I	SI	23.07.01	Secreção ocular	UN	<u>5*</u>	1339
	SI	20.08.01	Urina	UN	<u>6*</u>	3099
	SI	20.08.01	Urina	UN	7	3112
	SI	20.08.01	Sangue	UN	<u>9*</u>	3127
	SI	12.09.01	Ponta de cateter	UN	10	5102
	SI	26.09.01	Ponta de cateter	UN	11	5645
	SI	23.10.01	Urina	UN	<u>12*</u>	6354
	SI	05.11.01	Urina	UN	<u>13*</u>	6691
	SI	05.11.01	Ponta de cateter	UN	14	6694
	SI	09.11.01	Sangue	UN	<u>15*</u>	6822
	SI	13.11.01	Urina	UN	<u>16*</u>	6878
	SI	17.11.01	Ponta de cateter	UN	<u>17*</u>	6966
	SI	13.08.01	Urina	UN	<u>70*</u>	2637
	SC	11.09.01	Secreção nasal	UN	18	2888
	SC	29.08.01	Secreção orofaringe	UN	<u>20*</u>	2643
	SC	06.09.01	Secreção nasal	UN	<u>21*</u>	2745
	SC	29.08.01	Secreção orofaringe	UN	<u>23*</u>	2651
	SC	11.09.01	Secreção orofaringe	UN	24	2889
	SC	02.10.01	Secreção orofaringe	UN	<u>25*</u>	3268
	SC	06.09.01	Secreção orofaringe	UN	26	2740
	SC	18.09.01	Secreção orofaringe	UN	28	2989
	SC	22.10.01	Secreção nasal	UN	30	3463
	SC	07.11.01	Secreção orofaringe	UN	42	3615
	SC	06.09.01	Secreção orofaringe	UN	43	2738-1
	SC	25.09.01	Axilar/Inguinal	UN	44	3218-2
	SC	01.10.01	Secreção orofaringe	UN	45	3240-a
	SC	01.10.01	Secreção orofaringe	UN	46	3240-b
	SC	01.10.01	Secreção orofaringe	UN	47	3240-d
	SC	08.10.01	Secreção orofaringe	UN	48	3330-2
	SC	22.10.01	Secreção orofaringe	UN	49	3462-1
	SC	22.10.01	Secreção orofaringe	UN	<u>50*</u>	3462-3
	SC	06.11.01	Secreção orofaringe	UN	<u>51*</u>	3598-1
	SC	28.01.02	Secreção orofaringe	UN	<u>59*</u>	6020
	SC	16.01.02	Material retal	UN	60	5039-2
	SC	18.12.01	Secreção orofaringe	UN	57	3958
	SC	18.12.01	Secreção orofaringe	UN	<u>58*</u>	3956
	HE	21.09.01	Secreção orofaringe	UTI-Neo HE	<u>35*</u>	3089-2
	HU	20.03.02	Secreção	UTI-Pedatria	<u>72</u>	3088
	HU	28.08.02	Sangue	Pedatria	<u>62</u>	3667
	AS	01.10.01	Porta incubadora	UN	<u>53*</u>	2787
	AS	01.10.01	Porta incubadora	UN	<u>52*</u>	2784
	MS	29.11.01	Mãos	UN	<u>55*</u>	3746
	MC	12.12.01	Mãos	UN	<u>56*</u>	3918
	MC	21.09.01	Mãos	UN	<u>54*</u>	3128
	MC	25.09.01	Mãos	UN	64	3205
	MC	01.10.01	Mãos	UN	65	3258
	MC	01.10.01	Mãos	UN	76	3259
MC	19.10.01	Mãos	UN	77	3440	
MC	19.10.01	Mãos	UN	78	3442	

	MC	19.10.01	Mãos	UN	79	3444
	MC	19.10.01	Mãos	UN	80	3496
	MC	28.10.01	Mãos	UN	81	3498
	MC	01.11.01	Mãos	UN	82	3578
	MC	01.11.01	Mãos	UN	83	3580
II	HE	21.09.01	Secreção orofaringe	UTI-Neo HE	<u>31</u>	3087
	HE	21.09.01	Secreção orofaringe	UTI-Neo HE	33	3089-1
	HE	21.09.01	Secreção orofaringe	UTI-Neo HE	36	3097
III	CE	29.10.01	Secreção orofaringe	UN	<u>22</u>	3533-1
	CE	29.10.01	Secreção orofaringe	UN	<u>27</u>	3525
	CE	29.10.01	Secreção orofaringe	UN	29	3539-1
IV	HU	11.03.02	Sangue	UTI	<u>69</u>	2576
	HU	19.03.02	Sangue	Enf. Mascul.	<u>71</u>	2996
	HU	17.06.02	Urina	Enf. Mascul.	<u>75</u>	8041
V	KA	1999	Secreção orofaringe	UN-1999	32	4-ent
	KA	1999	Secreção orofaringe	UN-1999	<u>19</u>	3-ent
VI	HE	21.09.01	Secreção orofaringe	UTI-Neo HE	<u>37</u>	3101
VII	CE	19.10.01	Material nasal	UN	<u>34</u>	3534-1
VIII	SI	20.08.01	Sangue	UN	8	3125
IX	HU	19.10.01	Secreção de pele	Enf. Mascul.	<u>63</u>	6237
X	HU	08.10.01	Sangue	Enf. Femin.	<u>73</u>	5955
XI	HU	05.11.01	Urina	Pediatria	<u>74</u>	6672
XII	HU	03.07.01	Liq.Peritoneal	Enf. Mascul.	<u>68</u>	147
XIII	HU	23.08.01	Urina	Enf. Femin.	<u>61</u>	3413

* Relativo ao período de isolamento e classificação da amostra. SI: surto infecção; SC: surto colonização; HE: isolado na UTI-Neo do Hospital Hevangélico de Londrina; HU: isolado em outras enfermarias e UTI do HURNP; AS: ambiente superfícies da UN; MS: mãos da auxiliar de enfermagem "S"; MC: mãos da auxiliar de enfermagem "C"; CE: colonização endêmica; KA: *K. pneumoniae* causadora de surto na UN do HRNP em 1999 _ Os números relativos ao gel de agarose (PFGE) grifados indicam as cepas representativas utilizadas para a montagem do dendrograma

* Cepas agrupadas com similaridade superior a 85% através do coeficiente de Dice



Nº *	Local	Data coleta
05	SI	23.07.01
12	SI	23.10.01
06	SI	20.08.01
09	SI	20.08.01
13	SI	05.11.01
15	SI	09.11.01
16	SI	13.11.01
17	SI	17.11.01
21	SC	06.09.01
23	SC	29.08.01
25	SC	02.10.01
52	AS	01.10.01
53	AS	01.10.01
54	MC	21.09.01
55	MS	29.11.01
56	MC	12.12.01
50	SC	22.10.01
51	SC	06.01.01
58	SC	18.12.01
59	SC	28.01.01
70	SI	13.08.01
35	HE	21.09.01
20	SC	29.08.01

Figura 20- Dendrograma da porcentagem de relação entre 43 cepas representativas do surto. Calculado pelo coeficiente de Dice e representado pelo UPGMA.

Incluídas amostras representativas de pacientes, ambiente, funcionários e controles

* ver Tabela 11

5.9.5.5 Relação entre perfis gerados

Os perfis gerados pelo tamanho e número de plasmídios foram comparados aos gerados pela PFGE. A concordância entre os métodos foi observada em 19 das 32 cepas (57,3%), sendo que para as cepas classificadas como perfil I (PFGE) foram observados quatro padrões de plasmídios (B, C, D e F). Mesmo em cepas colhidas de um mesmo paciente (10 e 17) o perfil plasmidial definiu diferentes perfis além do A (F e B, respectivamente)(Tabela 12).

O perfil de sensibilidade ou outras características fenotípicas não apresentaram correlação com as alterações dos perfis plasmidiais.

Tabela 12- Comparação da tipagem obtida pelo perfil plasmidial e pela PFGE de 32 cepas de *K. pneumoniae* ESBL

Amostra	Paciente	Classificação	Perfil plasmidial	PFGE	Data da cultura
1339	16	SURTO INFECÇÃO	A	I	23.07.01
3127	7	SURTO INFECÇÃO	A	I	20.08.01
5102	7	SURTO INFECÇÃO	A	I	12.09.01
5645	17	SURTO INFECÇÃO	A	I	26.09.01
6354	24	SURTO INFECÇÃO	F	I	23.10.01
6694	27	SURTO INFECÇÃO	F	I	05.11.01
6878	10	PÓS-SURTO INFECÇÃO	F	I	13.11.01
2636	18	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	29.08.01
2640	21	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	30.08.01
2643	15	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	29.08.01
2647	22	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	29.08.01
2651	4	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	29.08.01
2740	20	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	06.09.01
2745	6	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	06.09.01
3463	4	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	05.09.01
2995	10	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	18.09.01
3268	17	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	02.10.01
3531	29	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	29.10.01
3956	31	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	18.12.01
2997	17	SURTO COLONIZAÇÃO	B	I	18.09.01
3615	4	SURTO COLONIZAÇÃO	B	I	07.11.01
3958	12	SURTO COLONIZAÇÃO	B	I	18.12.01
2989	8	SURTO COLONIZAÇÃO	A	I	18.09.01
2784		AMBIENTE	A	I	05.09.01
2787		AMBIENTE	B	I	05.09.01

3746	MÃOS	B	I	29.11.01
3918	MÃOS	B	I	12.12.01
3440	MÃOS	C	I	19.10.01
3089-1	HOSP. EVANGÉLICO	C	II	21.09.01
3087	HOSP. EVANGÉLICO	C	II	21.09.01
3089-2	HOSP. EVANGÉLICO	D	I	21.09.01
3097	HOSP. EVANGÉLICO	E	II	21.09.01

6 DISCUSSÃO

Klebsiella spp. são conhecidos agentes comunitários de infecções urinárias e pneumonia em etilistas crônicos, entretanto, a maioria das infecções causadas por este gênero estão associadas à hospitalização, de modo especial em indivíduos imunocomprometidos (KO, et al 2002). Estima-se que seja responsável por 8% das infecções hospitalares nos Estados Unidos e na Europa (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). As infecções nosocomiais causadas pelo gênero *Klebsiella* são relacionadas principalmente à espécie *pneumoniae*, enquanto que a *oxytoca* é observada com menor frequência, sendo descrita em surtos de UTI-Neo (BERTHELOT et al, 2001; JEONG et al, 2001).

As infecções causadas pelo gênero *Klebsiella* têm chamado a atenção devido a sua frequência crescente em Unidades de Terapia Intensiva. Dados do *National Nosocomial Infectious Surveillance System* (NNISS) sobre as infecções da corrente sanguínea e urinária nos períodos de 1986 a 1989 e de 1990 à 1995 ilustram bem este aumento. Enquanto as infecções da corrente sanguínea causadas por bacilos Gram-negativo tiveram uma queda relativa de 16%, passando de 23,2% no primeiro período observado para 19,5% no segundo, as infecções causadas por *Klebsiella* spp. apresentaram um aumento relativo de 21,8%, passando 2,6% para 3,2%. O mesmo fenômeno foi observado com relação aos bacilos Gram-negativo como agentes etiológicos das infecções urinárias, com queda relativa de 10% entre os dois períodos, passando de 52,2% no primeiro para 47% no período seguinte, enquanto que o isolamento de *K. pneumoniae* apresentou um aumento de 22,6%, passando de 4,8% para 6,2% (FRIDKIN, WELBEL e WEINSTEIN, 1997). Do mesmo modo, Krontal et al (2002) observaram entre 1988 e 1997 o aumento no número de infecções causadas por *K. pneumoniae* em pacientes pediátricos do sul de Israel, tendo emergido como o agente mais freqüente em bacteremias.

Em concordância com o aumento na frequência de isolamento, a literatura traz inúmeros casos de surtos causados por *Klebsiella* spp., especialmente nas unidades

pediátricas e de UTI-Neo, onde são agentes principalmente de quadros sépticos, tanto em infecções precoces quanto tardias (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Estão descritos vários surtos neste grupo de pacientes em todo o mundo: Israel (FLIDEL-RIMON et al, 1996), Turquia (AYAN et al, 2003), Arábia Saudita (AL-RABEA et al, 1998), Rússia (SEL'NIKOVA et al, 1992), República Eslovaca (BLAHOVA, et al, 1998), Tunísia (HAMOUDA, 2003), Austrália (EISEN et al, 1995); Espanha (ASENSIO et al, 2000) e Brasil (PESSOA-SILVA et al, 2003; OTMAN et al, 2002), entre outros.

Utilizando a ferramenta de busca do site PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) com as palavras chave *Klebsiella* e *outbreak* entre os anos de 1990 e março de 2003, foram listadas 154 descrições de surtos, sendo possível classificar 102 estudos quanto à população afetada. Ficaram em primeiro lugar os pacientes adultos internados em enfermarias (34%), seguido por neonatos (30%), pacientes de UTI geral (17%), pacientes pediátricos (13%) e de casas de repouso (2%), sendo que a população não foi definida em 8% dos estudos, enquanto que em alguns casos estiveram envolvidas mais de uma unidade de internação. Entretanto, ao agruparmos somente as descrições envolvendo pacientes pediátricos, teremos o maior valor, alcançando 43%.

A predileção pela população pediátrica, em especial pela de recém nascidos, pode ser justificada por fatores inerentes do hospedeiro, como a imaturidade do sistema imune (baixos títulos de anticorpos, anormalidades qualitativas de neutrófilos e baixa atividade do complemento) e a fragilidade de barreiras mucosas e da epiderme (BERTHELOT et al, 2001). Também devem ser lembradas as características de virulência do microrganismo, no caso da *Klebsiella*, a produção de cápsula, adesinas, lipopolissacarídeos, sideróforos e a resistência ao efeito bactericida do soro (GUPTA, 2002; PODSCHUN. e ULLMANN, 1998).

A resistência aos antimicrobianos surge como um agravante de peso neste contexto. A tolerância do gênero *Klebsiella* spp. aos ambientes pobres em umidade e a sua

habilidade em carrear e trocar plasmídios a torna um vetor de grande competência para a disseminação de genes produtores de ESBL (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Em revisão sistematizada, Holmberg e Solomon (1987) definiram o impacto das infecções causadas por microrganismos resistentes comparado às infecções causadas pelos mesmos microrganismos quando sensíveis. Foram avaliados 175 estudos relativos a infecções hospitalares e comunitárias. Para ambas as populações a mortalidade, a probabilidade de internação e o tempo de internação foram pelo menos duas vezes maiores para o grupo de pacientes infectados por multirresistentes quando comparados ao grupo infectado por cepas sensíveis da mesma espécie bacteriana. Segundo o *Institute of Medicine*, em 1998 foram estimados os gastos com a resistência bacteriana em torno de quatro a cinco milhões de dólares americanos/ano. Entretanto, definir o real impacto econômico da resistência bacteriana ainda é um desafio (McGOWAN, 2001).

As infecções hospitalares constituem evento indesejável e uma condição onerosa em termos materiais e emocionais tanto para a instituição, quanto para o paciente. A taxa aceitável de infecção hospitalar em UTI-Neo pode variar entre 15% e 20% para pacientes com menos de 1500 g e até 40% em pacientes menores que 1000 g ou menos que 28 semanas de gestação (HUDOME e FISHER, 2001). Entretanto, as dificuldades de notificação nesta população fazem com que as taxas descritas sejam subestimadas (WEINSTEIN, 2001).

Em 1998 foram registradas 88.000 mortes/ano nos Estados Unidos relacionadas às infecções hospitalares e em 1992 tais infecções foram responsáveis por gastos na ordem de quatro e meio milhões de dólares (JASNY e BLOOM, 1998; CDC, 1992). Assim sendo, ao assumirem proporções de surto, tais infecções devem ser abordadas com a devida gravidade, envolvendo todas as equipes do hospital em ações emergenciais de detecção e controle.

Segundo O'Brien e Stelling (1996):

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Observar que dois pacientes, em uma mesma unidade, apresentam o mesmo hematócrito ou natremia, não tem maior significado. Entretanto, observar que estes pacientes apresentam bactérias da mesma espécie, resistentes aos mesmos antimicrobianos, pode ser indício de um surto (O'BRIEN e STALLING, 1996).

O diagnóstico de surtos requer o conhecimento da história das infecções normalmente ocorridas (endêmicas). Um aumento estatisticamente significativo sobre as tendências endêmicas, ou o isolamento de um agente ou mecanismo de resistência raros, devem ser considerados como surtos e merecem a investigação adequada (BECK-SAGUE, JARVIS e MARTONE, 1997).

O presente estudo analítico e descritivo abordou um surto causado por *K. pneumoniae* multirresistente ESBL que se estendeu por sete meses em uma UTI-Neonatal, culminando com a erradicação do agente. Para tanto, foi avaliada a realidade da microbiota endêmica naquele ambiente nos 18 meses anteriores e nos 11 meses posteriores, totalizando um período de trinta e seis meses de observação (Figura 07). Foram desenvolvidas análises epidemiológicas, com o desenho de um estudo de caso-controle, associadas a um extenso estudo microbiológico e molecular, com a utilização de genotipagem. Como intervenção direta, foram instituídas medidas de controle e prevenção baseadas nas Precauções Padrão preconizadas pelo CDC (GARNER, 1996), com a participação ativa da CCIH, através do SPCIH.

A UTI-Neonatal constitui um laboratório extremamente rico para o estudo e a compreensão dos mecanismos envolvidos na disseminação e manutenção de surtos causados por bacilos Gram-negativo, em especial os multirresistentes. A origem estéril de grande parte dos pacientes permite o acompanhamento do agente etiológico sem interferências significativas com a microbiota endêmica.

Especificamente na UN do HURNP, a microbiota predominante observada no período foi a de cocos Gram-positivo, representada principalmente pelos Estafilococos

coagulase negativa, o que denota colonização com a microbiota residente da equipe médica ou dos familiares; seguidos pelas enterobactérias e não fermentadores, que estão relacionados à microbiota transitória da equipe e refletem mais diretamente a população microbiana hospitalar (MAKHOUL et al, 2002; JARVIS, 1996).

Na análise da curva de frequência de todos os microrganismos isolados durante os três anos do estudo, todos os agentes microbianos computados foram mais freqüentes no segundo semestre de 2001, coincidindo com o surto, o que pode ser uma evidência indireta de quebra dos cuidados e falha na higienização das mãos. Entretanto, o aumento observado no segundo semestre de 2002 provavelmente esteve relacionado ao aumento do número de culturas colhidas em comparação aos anos anteriores, passando de 630 em 2000, para 780 em 2001 e 812 em 2002 (Figura 07).

A prevalência de *K. pneumoniae* e *E. coli* ESBL em todo o HURNP assumiu diferentes tendências no período observado. Enquanto as *K. pneumoniae* ESBL oscilaram entre 30,8% (2000), 23,9% (2001) e 30,2% (até maio de 2002), no mesmo período as *E. coli* ESBL mantiveram a tendência crescente de 2,9%, 3,8% e 4,9% (Figura 08). Uma vez que a metodologia de detecção não foi alterada, pode-se especular que a queda de *K. pneumoniae* ESBL em 2001 pudesse estar relacionada à supressão de ceftazidima na instituição em julho de 2000.

A descrição de produtoras de ESBL tem apresentado uma variação significativa entre diferentes países e mesmo entre diferentes instituições (HERNANDÉZ, PASCUAL e CANTÓN, 2003). Levantamento realizado pelo Grupo de Estudos em Infecção Hospitalar da Espanha, totalizando 40 hospitais no ano de 2000, demonstrou que 69,9% (170/262) das *E. coli* e 86,4% (70/81) das *K. pneumoniae* foram produtoras de ESBL (HERNANDÉZ, PASCUAL e CANTÓN, 2003). Entretanto, no Brasil o Programa Sentry definiu a frequência de isolamento de produtoras de ESBL entre os anos de 1997 e 2000 como

sendo de 8,4% (57/678) em *E. coli* e 50,7% (219/432) em *K. pneumoniae* (SADER et al, 2001).

O achado de produtores de ESBL especificamente na UN foi um evento raro no período pré-surto (Figuras 09 e 09a). Os primeiros registros foram de uma *E. coli* ESBL recuperada de um paciente colonizado e outra de uma infecção, em janeiro de 2000. Nova cepa de *E. coli* ESBL foi obtida somente após 15 meses (9 de abril de 2001) em um paciente com infecção urinária. Após dez dias, isolou-se deste mesmo paciente a primeira cepa de *K. pneumoniae* ESBL desde janeiro de 2000. Esta cepa foi obtida em uma secreção de onfalite, juntamente com um novo isolado de *E. coli* ESBL e um Estafilococo coagulase negativa. Tais achados coincidentes permitiram suspeitar de uma possível troca de plasmídios de resistência entre os bacilos Gram-negativo obtidos.

Após mais de um ano e quatro meses sem o isolamento de *K. pneumoniae* ESBL na UN, o achado de um paciente colonizado em abril de 2001 (ISR) e dois pacientes infectados em junho (paciente 1 e 15), seguidos de dois em julho (paciente 3 e 16) e mais três infectados em agosto (pacientes 7, 17 e 20) fizeram com que a CCIH iniciasse o processo de controle e identificação das causas do surto (Tabela 01 e 01a). Deve-se reconhecer o hiato entre os resultados obtidos em junho e julho e a identificação do surto como tal, somente em agosto. Infelizmente, as cepas de *K. pneumoniae* isoladas em abril, junho e julho não foram estocadas pelo Laboratório de Microbiologia do HURNP, desse modo não foi possível estabelecer a relação genética entre os primeiros isolados, ainda que o perfil de sensibilidade tenha sido o mesmo.

A definição do caso índice foi estimada retrospectivamente. O paciente 1, internado na UTI-Neo em 11 de junho de 2001, evoluiu a óbito em 12 dias. Na seqüência, foram diagnosticadas novas infecções pela mesma cepa em outros dois pacientes, um na UTI-

Neo (paciente 3, internado em cinco de julho) e outro na UCI (paciente 15, internado em 21 de junho), estes ficaram internados por 19 e 75 dias, respectivamente (Tabela 01 e 01a).

Como se observa na curva de incidência de pacientes infectados e colonizados, apenas no mês de agosto as culturas de vigilância detectaram um número excessivo de colonizações, lembrando que os dois casos de colonização descritos em junho e julho foram computados em consequência das infecções documentadas (Figura 10). Após este estudo, foram alteradas as rotinas de vigilância nas UTI do HURNP, sendo mantida apenas a investigação direcionada para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina.

A classificação das culturas positivas para *K. pneumoniae* quanto a infecção ou colonização considerou informações clínicas, microbiológicas e epidemiológicas; sendo complexa em algumas situações. Os pacientes 3, 19 e 28 tiveram amostras de ponta de cateter colhidas sem indicação clínica, por ocasião da alta hospitalar, positivas para a cepa epidêmica, deste modo, tais resultados foram considerados como colonização. O paciente 20 apresentou três culturas positivas para *K. pneumoniae* no dia 20 de agosto de 2001, a primeira em urina, a segunda em ponta de cateter (>15 ufc) e a terceira em sangue. As duas primeiras foram produtoras de ESBL e a terceira foi totalmente sensível aos beta-lactâmicos. Mais tarde, as duas primeiras foram definidas como geneticamente relacionadas (perfil I) e a terceira não relacionada (perfil VIII), sendo computada como contaminação de coleta. Em 21 de agosto, o paciente 8 teve cultura de secreção conjuntival com *K. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, na impossibilidade de se obter as contagens de cada agente, ainda que pela bacterioscopia direta do material, e conhecendo o maior valor preditivo positivo do *S. aureus* para infecção ocular, a *K. pneumoniae* foi definida como colonizante (Tabela 01 e 01a).

A UN foi caracterizada como uma unidade que trabalha em condições extremas de ocupação, justificada pela grande demanda de pacientes de alto risco e o pequeno número de leitos disponíveis pelo convênio do SUS na região. No período pré-surto, especificamente de janeiro a julho de 2001, a taxa de ocupação da UN seguiu com uma tendência menor ou igual à média calculada de 2000 a 2002 (113%, \pm 19,7%). Sendo que em agosto de 2001 passou para 132%, quando a disseminação da cepa epidêmica deu-se com maior intensidade (Figura 11). Nos meses de agosto e setembro a prevalência mensal de pacientes infectados e colonizados chegou a 16 e 15 pacientes, respectivamente, caracterizando o período de maior pressão de colonização.

Coincidentemente, os dois primeiros pacientes do período do surto (paciente 1 e paciente 15) tiveram infecções exsudativas de pele, sendo possível que esta localização tenha contribuído para a disseminação inicial da cepa epidêmica, levando à maior contaminação do ambiente e da equipe (Figura 14).

Após a adoção das medidas de controle, foi observada a tendência de queda gradual e constante dos pacientes infectados/colonizados até abril de 2003. Neste período, a densidade de incidência dos RN infectados e de infecções oscilou em dois picos, o primeiro em agosto e o segundo em novembro, quando as medidas de intervenção foram reforçadas junto à UN (Figura 12). Como registra a literatura, os resultados obtidos com intervenções de controle de infecção, como a adesão à higienização das mãos (WEINSTEIN, 2001), costumam ser passageiros e com tendência de retorno aos níveis iniciais após algum tempo.

Traçando um paralelo entre as taxas acima expostas e o número de funcionários ativos da UN, ficou evidente a associação negativa do número de funcionários frente às taxas de ocupação e de novas infecções/colonizações. O aumento nas taxas de ocupação entre junho e agosto foi acompanhado pelo aumento do número de infecções e, como o número de funcionários não foi alterado, a proporção de funcionários para 100

pacientes-dia/mês caiu de 6,51 em junho para 5,39 em julho e 4,77 em agosto. A partir de setembro, com o fechamento da unidade para novas internações e a queda na ocupação, a proporção funcionário/paciente voltou a aumentar. Os meses de outubro e novembro caracterizaram um novo descontrole da situação, pois mesmo com uma ocupação constante e inferior a 100%, a densidade de incidência de pacientes infectados voltou a subir, declinando novamente a partir de dezembro (Figura 15).

A distribuição topográfica das infecções registradas pela cepa epidêmica no período do surto refletiu o risco dos procedimentos invasivos realizados e a fragilidade das defesas naturais do hospedeiro neonato. Estando em primeiro lugar a infecção do acesso vascular (33%), seguida de infecções do trato urinário (20,8%), sepse (16,6%), conjuntivite (12,5%), cutâneo/cirúrgica (12,3%) e de coto umbilical (4,1%) (Figura 13).

Para a determinação de fatores de risco, grande parte dos estudos reúne a condição de colonização e infecção em um grupo único, confrontando-o com os controles. Enquanto a análise dos casos costuma ir até o achado da primeira cultura positiva para a cepa epidêmica, para os controles a observação leva em consideração todos os procedimentos até a alta hospitalar (FILHO, 2003; ASENSIO, 2000). Entretanto, tal análise pode ser prejudicada em populações onde os controles tenham longos períodos de internação (PESSOA-SILVA et al, 2003).

Neste estudo, buscou-se distinguir os fatores associados à aquisição da cepa epidêmica, totalizando colonizados e infectados. A observação da exposição às variáveis estudadas nestas três análises foi realizada segundo os três modelos de tempo descritos. Seguindo desenho proposto por Pessoa-Silva et al (2003). A análise de risco para os controles foi feita somente até a mediana do número de dias para a primeira cultura com a cepa epidêmica nos colonizados, aproximando-se assim o período de observação entre casos de controles.

Diferentemente dos resultados obtidos por Pessoa-Silva et al (2003), que observaram variações no risco entre os dois modelos, tanto para o uso de cateteres vasculares, quanto para combinação de cefalosporinas com aminoglicosídeos, não foram verificadas diferenças no significado estatístico das associações nos modelos tempo-dependente estudados. Entretanto, a casuística foi muito diferente entre as duas pesquisas. Pessoa-Silva et al (2003) descreveram o surto com uma população de 464 expostos observados durante 22 meses de surto, totalizando 13 pacientes infectados e 206 pacientes colonizados, com uma relação entre exclusivamente colonizados/infectados de 15,8 (206/13).

Na UN do HURNP, a população exposta foi de 218 RN observados durante os sete meses de surto, totalizando 11 pacientes infectados e 20 colonizados, com uma relação entre exclusivamente colonizados e infectados de 1,81 (20/11). A prevalência de aquisição da cepa epidêmica na população exposta durante o surto foi de 14,22% (31/218), enquanto a prevalência de infectados foi de 5% (11/218). Seguindo a evolução natural do processo de infecção, os pacientes infectados foram também computados como colonizados (JARVIS, 1996; BONTEN e WEINSTEIN, 1996; SELDEN et al, 1971).

O tempo total de internação não esteve associado à infecção ($p= 0,326$) ou colonização ($p= 0,179$), entretanto quando considerado o período de internação até a data da primeira cultura positiva, a associação passou a ter significado estatístico tanto para a infecção ($p < 0,05$), quanto para a colonização exclusiva ($p < 0,05$). Os grupos de casos e controles foram semelhantes quanto a idade gestacional, a distribuição entre os sexos, o peso ao nascer e índice de Apgar <7 no quinto minuto de vida (Tabela 02).

A análise dos procedimentos de risco permitiu estabelecer associação com o desenvolvimento de infecção ou colonização apenas no modelo que comparou todo o período de internação de casos e de controles. Neste modelo, o tempo de uso de sonda para alimentação enteral esteve associado à aquisição da cepa epidêmica ($p < 0,05$), entretanto a

relação específica com infectados ($p= 0,105$) ou exclusivamente colonizados ($p= 0,129$) não pode ser estabelecida. A frequência do uso de hemoderivados pode ser associada aos infectados ($p < 0,05$), porém o mesmo não foi observado para os exclusivamente colonizados ($p= 0,388$). O tempo de uso de cateteres venosos centrais ou periféricos foi associado à aquisição da cepa epidêmica ($p < 0,05$), tanto para infectados ($p < 0,05$), quanto para os exclusivamente colonizados ($p < 0,05$) (Tabela 03).

As outras variáveis estudadas não demonstraram associação com a aquisição da cepa epidêmica, seja em infecção ou colonização exclusiva. O mesmo foi observado com relação ao uso de antimicrobianos. Nos três modelos epidemiológicos avaliados não foi possível estabelecer a associação com o consumo de beta-latâmicos, aminoglicosídeos ou glicopeptídeos, tanto em análise de uso isolado, quanto na análise do uso combinado entre estas classes (beta-lactâmico com aminoglicosídeo, aminoglicosídeo com glicopeptídeo e glicopeptídeo com beta-lactâmico)(Tabelas 4 e 5).

Os fatores de risco associados à infecção descritos na literatura incluem o uso de cateteres vasculares, cirurgia abdominal de urgência, gastrostomia ou jejunostomia, colonização intestinal, tempo de internação em UTI, severidade da doença de base, cateter urinário e ventilação mecânica (PENA et al, 1998; JACOBY, 1997). Al-Rabea et al (1998) avaliaram um surto por *K. pneumoniae* relacionado à contaminação produtos infundidos e definiram a associação entre o uso de glicose (10%) ($p < 0,05$) e de hemocomponentes ($p < 0,05$) com o desenvolvimento de infecção da corrente sanguínea. Filho (2003) também relatou o uso de hemocomponentes como fator de risco independente para a infecção por *K. pneumoniae* em uma população de recém nascidos ($p < 0,05$). No HURNP todos os controles de qualidade microbiológica do Banco de Sangue foram realizados e estiveram dentro das normas de aceitação, sendo assim, acredita-se que o processo de transfusão, e não o hemocomponente, esteja associado ao isolamento da cepa epidêmica.

Embora o uso de hemoderivados, o tempo de uso de nutrição enteral e de cateter venoso tenham sido estatisticamente significativos, seria mais prudente interpretar tais achados como marcadores de diferenças entre o grupo de casos e controles do que propriamente fatores associados à infecção ou colonização, pois, sendo considerado o modelo de tempo total de internação, foram computados os procedimentos realizados mesmo depois da infecção/colonização já ter ocorrido.

O uso prévio de antimicrobianos associado à infecção e ao desenvolvimento de surtos por *K. pneumoniae* ESBL foi demonstrado por diversos autores em diferentes modelos de estudo (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Asensio et al (2000), em estudo observacional descreveram um surto causado por *K. pneumoniae* em uma UTI e enfermaria de cirurgia cardíaca pediátrica da Espanha. Na sua casuística foi possível demonstrar a associação independente entre o consumo de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos com o desenvolvimento de infecção e/ou colonização e que a redução no consumo destas classes auxiliou no controle do surto. No modelo estudado por Rebeck et al (2000) a ausência de associação foi justificada pelo uso de beta-lactâmicos combinados a inibidores de beta-lactamase, como piperacilina/tazobactam, em detrimento às cefalosporinas de terceira geração. Talvez, na UN do HURNP tal associação não esteja aparente pela baixa frequência de uso de cefalosporinas de terceira geração e pelo uso frequente de antimicrobianos em toda a população, sendo de 90% nos casos e 73% nos controles ($p= 0,109$), conforme alertam Beck-Sague, Jarvis e Martone (1997).

Alguns achados contrariaram a significância estatística, como o exemplo do paciente JF (Figura 14). Enquanto o tempo de internação para o primeiro isolamento da cepa epidêmica em sítio infectado teve uma mediana de 9 (4-23) dias e em sítio colonizado de 15,5 (5-57) dias ($p= 0,080$), o paciente JF passou 191 dias internado, foi submetido a inúmeros procedimentos de risco e teve 32 culturas colhidas, todas sem *K. pneumoniae* ESBL. Por

outro lado, seu gemelar (paciente 24) teve a primeira infecção pela cepa epidêmica documentada no 23º dia de internação.

O conjunto dos resultados obtidos fortaleceu a evidência de que o reservatório da cepa epidêmica estava nos próprios pacientes e que a manipulação constituiu o maior fator de disseminação, uma vez que não foi demonstrada uma fonte exógena no ambiente da UN ou mesmo em produtos contaminados.

Estudos epidemiológicos revelam que as infecções causadas por *K. pneumoniae* são freqüentemente precedidas pela colonização do trato gastrintestinal, que passa a ser o principal reservatório para a sua transmissão (STRUVE, FORESTIER e KROGFELT, 2003). Em 1971, Selden et al demonstraram que entre 31 pacientes colonizados em trato intestinal por *Klebsiella* durante a internação, 14 (45,1%) desenvolveram infecção pelo mesmo sorotipo; por outro lado, entre os 101 pacientes que não se tornaram portadores de *Klebsiella*, apenas 11 (10%) desenvolveram infecção por este agente ($p < 0,05$).

A disseminação horizontal da cepa epidêmica entre pacientes constitui uma importante via para *K. pneumoniae*. Assim, as mãos da equipe médica e de enfermagem são um importante veículo para a transmissão de microrganismos em UTI (ROSSOFF, BORENSTEIN e ISENBERG, 1995), bem como equipamentos contaminados com matéria orgânica de pacientes críticos, como a secreção de orofaringe e fezes. Deste modo, as medidas de controle objetivaram a quebra na disseminação. Para tanto, a educação da equipe, as medidas de barreira e os cuidados de isolamento foram os principais pontos de ataque. A higienização das mãos, o uso de luvas e aventais, o isolamento e identificação visual dos casos em coorte e a preocupação com a descontaminação do ambiente constituíram as principais medidas de controle entre todas as adotadas (Quadro 01), enquanto que a prescrição de antimicrobianos não sofreu alteração sistemática no seu fluxo. Ratificando o impacto das Precauções Padrão, Eveillard, et al (2001) aplicaram as recomendações do CDC em um

hospital escola francês durante um ano e demonstraram a redução de 54,9% na incidência endêmica de *K. pneumoniae* ESBL.

Embora tenha sido documentada a contaminação das mãos da equipe em duas funcionárias, estas não puderam ser definidas como responsáveis pela manutenção do surto, uma vez que a primeira foi prontamente afastada da UN e a segunda apresentou colonização transitória não mais detectada. Enquanto ainda atuava na UN, a primeira funcionária apresentou uma cultura negativa para *K. pneumoniae* em 14 de setembro, vindo a positivar uma semana após, em 21 de setembro. Deste modo, suspeita-se que não tenha participado na introdução da cepa na UN, visto que os primeiros isolados epidêmicos ocorreram em junho, julho e agosto. Para complementar a investigação relativa a esta funcionária e buscar definir a fonte da sua colonização persistente, foram realizadas culturas, com o seu consentimento, de superfícies na sua residência. A pesquisa incluiu o ambiente e materiais de uso pessoal, como: a superfície da porta da geladeira, interruptores, telefone, bolsa, balcão da pia da cozinha, esponja de cozinha, água do filtro de barro, portas de armários, creme para as mãos e para o corpo, xampu, escova de dentes, bucha de banho e desodorante. Todos os resultados se mostraram negativos para *K. pneumoniae*. Do mesmo modo que as repetidas culturas de região retal e de fezes.

A associação entre onicomicose e a colonização persistente das mãos por *K. pneumoniae* ESBL em uma UTI-Neo foi relatada também por Nicolleti (2002). Foca et al (2000), ainda relataram a relação com a contaminação por *Pseudomonas aeruginosa*. Partindo de tais evidências microbiológicas, a CCIH do HURNP iniciou um projeto de avaliação da saúde das mãos de todos os funcionários das UTI, tendo em vista a possibilidade de atuarem como vetores na transmissão de microrganismos multirresistentes.

Mesmo os funcionários que tiveram cultura das mãos negativa provavelmente participaram como disseminadores da cepa epidêmica em algum momento,

principalmente após a assistência aos pacientes colonizados ou infectados. Quanto ao ambiente da UN, a contaminação evidenciada ocorreu em virtude de falhas na limpeza dos equipamentos, não podendo ser considerado como um reservatório propriamente dito.

A participação de outras fontes de microrganismos em surtos de infecções hospitalares também deve ser considerada, como a infecção com cepas endógenas, autógenas ou fômites mecânicos (GAILLOT et al, 1998; ROSSOFF, BORENSTEIN e ISENBERG 1995), entretanto seu impacto é específico em cada caso. Oelberg et al (2000), ilustraram a importância da disseminação ambiental de patógenos através de um modelo utilizando fragmento de DNA do vírus mosaico de couve-flor. Os autores mapearam a disseminação deste fragmento pela UTI-Neo com o auxílio da reação em cadeia da polimerase. Após a aplicação do marcador em um telefone, foram obtidas amostras de superfície de diferentes pontos da unidade em tempos pré-determinados. Após tempos pré-determinados, foram recuperados os fragmentos de DNA em outros telefones, em pranchetas de prescrição, superfície de ventilador mecânico, maçanetas de porta, superfície de monitores e mãos da equipe. Fora do ambiente da unidade o fragmento foi observado principalmente na central de enfermagem e na sala dos residentes.

O controle de antimicrobianos também constitui uma intervenção comum no controle de surtos causados por *K. pneumoniae* ESBL, pois o consumo de cefalosporinas de terceira geração, em especial de ceftazidima, tem sido associado à emergência deste mecanismo. Entretanto, as experiências com restrição de antimicrobianos tem se mostrado divergentes, enquanto alguns autores alcançaram resultados positivos (PATTERSON et al, 2000; RAHAL et al, 1998), outros não obtiveram sucesso (BISSON, G. et al, 2002), fato que denota a complexidade do problema e a necessidade de serem consideradas outras variáveis além da pressão de seleção antimicrobiana.

O manejo de surtos causados por produtoras de ESBL costuma agregar um conjunto de ações, incluindo principalmente medidas de barreira e restrição de antimicrobianos (ASENSIO et al, 2000; MEYER et al, 1993), o que dificulta a definição exata de qual medida gerou maior impacto. Alguns autores descrevem o controle com medidas exclusivas de barreira (COOVADIA et al., 1992; LUCET et al, 1999), outros com restrição de antimicrobianos (RICE et al, 1990). Mas, nem sempre a relação entre intervenções e controle é direta. Como alguns surtos são autolimitados, pode-se inferir erroneamente tal resultado às medidas adotadas. Para ilustrar essa dificuldade pode-se citar o estudo de Bernards et al (1998), nele foram descritos surtos por *Acinetobacter baumannii* em dois hospitais na Holanda após a transferência de pacientes infectados ou colonizados por este agente. Em ambos os hospitais o surto foi controlado, entretanto, no primeiro realizou-se uma extensa investigação e intervenção, enquanto que no segundo nenhuma medida adicional foi posta em prática. A relação entre causa e efeito pode ser aplicada com maior segurança quando existem reservatórios definidos para a cepa epidêmica. Seja um reservatório ambiental como, por exemplo, em um surto causado por gel de ultra-som (GAILLOT et al, 1998), umidificador de incubadora (JEONG et al, 2001) ou nutrição parenteral (BERTHELOT et al, 2001) contaminados; seja humano (COOVADIA et al, 1989), com a erradicação do surto após o afastamento do indivíduo fonte (NICOLLE, 2001).

A investigação microbiológica no presente estudo seguiu conforme orientam Beck-Sague, Jarvis e Martone (1997), incluindo apenas os pacientes, o ambiente, materiais e os funcionários epidemiologicamente relacionados, buscando evidências bem definidas para complementar o estudo epidemiológico. As culturas realizadas resultaram em um banco de microrganismos com mais de 250 isolados clínicos, totalizando mais de 900 réplicas, de onde foram selecionados amostras representativas do surto e os controles não relacionados utilizados na realização da tipagem fenotípica e genotípica (Tabela 07).

O estudo do perfil de sensibilidade revelou a múltipla resistência aos antimicrobianos, problema definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma questão de saúde pública mundial (WHO, 2001) (Tabela 08). Um exemplo da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos foi observado com o isolamento de cepas resistentes aos carbapenêmicos (paciente 4) (Figura 16). Foi nítida a evolução dos níveis de resistência, iniciando com a cefoxitina, passando para meropenem e por fim imipenem. Esta evolução pode ser acompanhada também pela CIM do meropenem, passando de sensível (CIM de 0,12 e 1,5 µg/mL) para intermediário (12 µg/mL) e, por fim, resistente (16 µg/mL), em um intervalo de 54 dias (Tabela 09). A diminuição na expressão da proteína de membrana externa de 36KDa pode ter ocorrido de maneira gradativa, justificando o gradiente na expressão da resistência, porém, novos estudos com estas cepas se fazem necessários. Ehrhardt et al (1992) descreveram a emergência de resistência ao imipenem, após terapia utilizando esta droga, em isolados de *Enterobacter aerogenes*. Neste caso foi observada a relação com a perda de uma proteína de membrana de 39 KDa juntamente com o aumento na produção de beta-lactamases.

O estudo de surtos de infecção hospitalar, na maior parte das vezes, requer a utilização de alguma prova de tipagem que avalie a similaridade genética entre cepas de uma mesma espécie. Deste modo, pode-se diferenciar as cepas epidêmicas das endêmicas normalmente encontradas e definir a hierarquia da sua disseminação pelo ambiente (PFALLER, 2001). Todo bom método de tipagem deve cumprir algumas condições, tais como: a) tipabilidade, possível de ser utilizada para diferentes microrganismos; b) reprodutibilidade, capacidade de mostrar o mesmo resultado em diferentes testes; c) poder de discriminação, habilidade em diferenciar cepas geneticamente não relacionadas e defini-las como tal; d) facilidade de execução, sendo uma técnica de baixa complexidade e e) facilidade de interpretação, permitindo a interpretação dos resultados com o máximo de clareza e

simplicidade (TENOVER, ARBEIT e GOERING, 1997). Entretanto, em países em desenvolvimento, ainda devem ser considerados o custo do material utilizado e a facilidade na aquisição de reativos e acessórios (BARTH, 2001).

Os métodos de tipagem podem se basear em características expressas fenotipicamente e/ou em padrões genotípicos dos microrganismos. O menor custo e a simplicidade operacional da maioria das técnicas fenotípicas possibilitaram a sua disseminação, podendo ser utilizada a antibiotipagem, a biotipagem, fagotipagem, o perfil enzimático ou protéico e a sorotipagem. Entretanto, estes métodos podem não ser suficientemente sensíveis para discriminar cepas epidemiologicamente não relacionadas (baixo poder de discriminação). A aplicação dos métodos fenotípicos tem demonstrado resultados insatisfatórios, com baixa tipabilidade e reprodutibilidade comprometida pela instabilidade da expressão gênica (TANG, PROCOP e PERSING, 1997). Características fenotípicas de perfil bioquímico e padrão de sensibilidade podem variar entre isolados de uma mesma linhagem no decorrer de um surto, principalmente em ambiente hospitalar. Mutações aleatórias, selecionadas por antibióticos, podem afetar uma ou mais vias bioquímicas e a aquisição ou perda de plasmídios de resistência podem alterar o padrão de sensibilidade (MASLOW e MULLIGAN, 1996).

No modelo em estudo, a biotipagem não pode ser considerada uma boa ferramenta para acompanhar a disseminação da cepa epidêmica. Deixando de diferenciar as cepas não epidêmicas, como as não produtoras de ESBL (Tabela 07). A antibiotipagem foi incongruente com uma cepa (2637), enquanto que as demais foram ratificadas pelos achados de PFGE. A baixa endemicidade de produtoras de ESBL na UN contribuiu para o maior poder discriminatório da antibiotipagem.

Dentre os resultados de sensibilidade, vale ressaltar que todos os métodos utilizados para a detecção de ESBL foram concordantes, não havendo dificuldades técnicas na

detecção e confirmação entre as cepas epidêmicas (Tabela 8a). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001) reconhece que as falhas na correta detecção de produtores de ESBL são um fator adicional para justificar sua rápida disseminação pelo mundo.

Os métodos genotípicos utilizados incluíram o perfil plasmidial e a PFGE. Os plasmídios são caracterizados como fitas de DNA circular covalentemente ligadas, sendo extra-cromossomais e dotadas de potencial para replicação autônoma. Podem transportar genes codificadores de diferentes informações, sejam de virulência, de atividade metabólica ou resistência aos antimicrobianos. Os chamados plasmídios conjugativos são ainda “móveis”, capazes de duplicar sua informação e passá-la para outra bactéria, ainda que de gênero diferente (JOHNSON e WOODFORD, 1998; PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Nadjar et al (2000), descreveram um surto em uma UTI na França, onde detectaram o gene codificador de beta-lactamase ACC-1 em plasmídios de *K. pneumoniae* e no cromossomo de cepas de *Hafnia alvei*, isoladas do mesmo ambiente. Deste modo, demonstrou a possibilidade de passagem deste material da *Hafnia* para a *K. pneumoniae*.

No presente estudo, o perfil plasmidial como forma de tipagem demonstrou menor poder de discriminação, reflexo da variabilidade intrínseca desta porção do DNA bacteriano (Figura 17). Variações no perfil plasmidial entre cepas geneticamente relacionadas foram observadas também por outros autores, como descrito por Silva et al (2001) e Filho (2003) (Tabela 12). Baseada no número e tamanho dos plasmídios, esta técnica fornece apenas informações iniciais de tipagem. Entretanto, o padrão de bandas obtido após a utilização de enzimas de restrição pode melhorar muito o seu poder de discriminação (TANG, PROCOP e PERSING, 1997).

Segundo Tenover, Arbeit e Goering (1997) o uso do perfil plasmidial deve considerar dois fatores de confusão importantes por não serem uma parte estável no genoma bacteriano. O primeiro diz respeito à disseminação horizontal de plasmídios, o que caracteriza

o surto de plasmídios. Assim, mesmo cepas geneticamente não relacionadas podem ser confundidas e apresentar o mesmo perfil. O segundo considera a mobilidade dos plasmídios, deste modo, mesmo cepas relacionadas podem perder ou receber plasmídios e serem classificadas como não relacionadas. Como exemplo, podem ser citados os isolados 2637 (13 de agosto de 2001) e 2643 (29 de agosto de 2001) obtidos do paciente 15, o segundo paciente infectado no período do surto (Figura 18). Nestas cepas observou-se a relação genética, através do PFGE, com discordância quanto ao perfil plasmidial e a produção de ESBL. Enquanto a 2643 foi produtora de ESBL e expressou múltipla resistência, a 2637 apresentou-se totalmente sensível aos beta-lactâmicos, inclusive às cefalosporinas de primeira geração. O perfil plasmidial da cepa sensível revelou uma banda pesada de baixa definição, com 107 MDa, e outra mais leve, com 63 MDa. A cepa resistente também apresentou duas bandas, mas com pesos diferentes, uma de 71 MDa e outra de 98 MDa. Porém, estudos mais detalhados com enzimas de restrição, *Southern blotting* ou sondas específicas de DNA deverão ser realizados para definir com maior clareza tais achados. Resultados semelhantes foram descritos por Eisen et al (1995) em um surto ocorrido numa UTI-Neo, onde a utilização da tipagem através de *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e o perfil plasmidial foram concordantes mesmo não havendo concordância quanto a produção de ESBL.

Com relação à emergência de resistência aos carbapenêmicos observada nos isolados 3330 e 3462, o perfil plasmidial apresentou padrões sensivelmente diferentes, tanto em número de bandas quanto no tamanho. Apesar desta variação, o fenótipo ESBL foi mantido inalterado (Figura 19). Infelizmente, a interpretação de tais achados não permite conclusões mais elaboradas. A relação entre a pressão exercida pelo uso de antimicrobianos e a menor expressão de uma proteína de membrana com alterações no perfil plasmidial, sem a perda do fenótipo ESBL, deve ser estudada mais a fundo. Informações adicionais no âmbito molecular devem ser levantadas para que se possa direcionar novos experimentos. O uso de

enzimas de restrição, técnicas de conjugação bacteriana, sondas de DNA, determinação do ponto isoelétrico ou a razão de hidrólise das enzimas produzidas (MACKENZIE, 1997) poderiam definir com maior clareza tais achados.

A precisa definição da relação genética entre isolados epidêmicos tem grande significado na investigação e adoção de medidas de controle (STRULENS, 1996). Caso os resultados da tipagem revelem cepas geneticamente relacionadas, pode-se dizer que a disseminação é clonal, o que denota transmissão horizontal entre diferentes pacientes. Neste caso, a adoção de medidas rigorosas de barreira pode ser suficiente para quebrar a cadeia de transmissão e solucionar o problema do surto. Contudo, se a tipagem revelar cepas epidêmicas geneticamente não relacionadas, pode-se suspeitar de seleção exercida pelo uso de antimicrobianos. Neste caso, a conduta de maior impacto passa a ser a revisão do uso de antimicrobianos na instituição (PFALLER et al, 2001).

A literatura traz a descrição de surtos que se desenvolveram em diferentes modelos de relação genética. Há os causados pela disseminação de uma única cepa (clonal) (PEÑA et al, 1998; NADJAR et al, 2000), de diferentes cepas (policlonal) (REBUCK et al, 2000; SCHIAPPA et al, 1996) ou mesmo de um mesmo plasmídeo em diferentes espécies ou gêneros (policlonal) (NEUWIRTH et al, 1996; PRODINGER et al, 1996; RICE et al, 1990). Ainda são descritos surtos combinados, como apresentado por Palucha et al (1999), com a disseminação de um plasmídeo (surto de plasmídeo) codificador de enzima SHV em cepas não relacionadas (policlonal) juntamente com a disseminação clonal de uma cepa produtora da enzima CTX-M. De maneira semelhante, Neuwirth et al (1996) observaram em uma UTI a transferência *in vivo* de plasmídios codificadores da ESBL TEM-24 a partir de *Enterobacter aerogenes* para diferentes cepas de *E. coli* e *Citrobacter freundii*. Caracterizaram-se dois modelos de surto, um clonal, através da disseminação da cepa epidêmica de *E. aerogenes* e o

outro policlonal, a partir da transferência do plasmídeo de TEM-24 para membros da família *Enterobacteriaceae*.

As técnicas moleculares (genotípicas) oferecem maior acurácia e poder discriminatório entre cepas relacionadas, pois se baseiam em características bacterianas estáveis e inerentes (OLIVE e BEAN, 1999). Muitos modelos de aplicação destas técnicas são apresentados pela literatura. Rebuk et al (2000) caracterizaram um surto de infecção hospitalar por *K. pneumoniae* produtora de ESBL em uma UTI pediátrica de transplantados. A demonstração da origem policlonal, baseada nos perfis de PFGE gerados, permitiu definir os fatores de risco e adequar as medidas de controle naquela população. Gazouli et al (1997), descreveram um surto por *K. pneumoniae* resistente a cefoxitina que, embora apresentasse 3 biotipos distintos e diferentes antibiogramas, revelou similaridade por técnicas de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC)-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e PFGE.

Mesmo em condições endêmicas, a epidemiologia molecular pode fornecer informações preciosas ao controle das infecções hospitalares. Villari, Iacuzio e Scarcella (1998) em estudo prospectivo, durante um ano, avaliando as infecções ocorridas em uma UTI-Neo, em um modelo não epidêmico, demonstraram o uso de técnicas de epidemiologia molecular como ferramenta importante para definir a origem das infecções diagnosticadas. Hacek et al (1999) avaliaram o impacto médico e econômico no uso da epidemiologia molecular como ferramenta rotineira em um hospital universitário com 683 leitos e mais de 250.000 saídas/ano. Foi comparado o período de 24 meses anteriores à utilização das novas técnicas com os 24 meses seguintes. A taxa de infecção por 1000 pacientes/dia entre ambos os períodos registrou uma queda de 10%, de 6,49 para 5,79 ($p < 0,05$), com diminuição de 23% no número de infecções, o que significou uma redução de 270 pacientes/ano com infecção hospitalar e uma economia de US\$ 4.368.100 durante os dois anos do estudo.

Desenvolvido por Schwartz e Cantor (1984), o PFGE baseia-se na restrição do DNA bacteriano com enzimas que reconhecem poucos sítios ao longo do DNA cromossômico. O resultado são grandes fragmentos DNA (10-800Kb) que não poderiam ser separados eficientemente por eletroforese convencional. Na PFGE a orientação do campo elétrico através do gel é modificada periodicamente (*pulsed*), permitindo que fragmentos de DNA da magnitude de megabases sejam separados efetivamente por diferença de tamanho (TENOVER et al, 1995). Conseqüentemente, a PFGE permite a comparação do DNA cromossômico com perfis bem mais simples do que aqueles gerados por enzimas de restrição de alta frequência de corte. Todas as bactérias podem, teoricamente, ser tipadas por PFGE com resultados altamente reprodutíveis e elevado poder discriminatório. Uma exceção a ser citada ocorre com *Clostridium difficile*, onde nucleases endógenas degradam o DNA juntamente com a enzima de restrição, gerando padrões inespecíficos (TENOVER, ARBEIT e GOERING, 1997).

A tipagem das cepas obtidas na UN do HURNP, através da PFGE, evidenciou a relação genética entre os agentes de infecção, de colonização, do ambiente e de mãos (Tabelas 10 e 11) (Figura 20). Dentre as 73 cepas testadas pelo PFGE, 54 puderam ser classificadas como perfil I, incluindo cepas representativas de sítios infecciosos, colonizados, do ambiente e das mãos de duas funcionárias. Foram ainda identificadas cepas com este perfil fora da UN, na UTI-pediátrica do HURNP e em um outro hospital de médio porte de Londrina, o Hospital Evangélico. Deste modo, foi possível caracterizar a transmissão intra-hospitalar e inter-hospitalar. Neuwirth et al (1996) e Eisen et al (1995) descreveram a disseminação intra-hospitalar de produtoras de ESBL, selecionadas no ambiente da UTI, em decorrência da transferência de pacientes entre diferentes unidades de internação. Lucet et al, (1999) também relataram a transmissão entre enfermarias de internação, além da transmissão inter-hospitalar. Monnet et al (1997), descreveram evidências epidemiológicas e laboratoriais

da transmissão de *K. pneumoniae* ESBL entre hospitais tão distantes quanto 32 quilômetros, documentando a similaridade das cepas através da PFGE.

Na UN do HURNP a disseminação intra-hospitalar de um dos isolados (3088, em 20 de março de 2002) pode ser relacionada à transferência dos paciente 4 e 17 para a UTI-pediátrica em 27 de setembro de 2001, ficando internados nesta unidade até 27 de novembro e 5 de dezembro de 2001, respectivamente. Entretanto, o isolamento da cepa 3667 em 28 de agosto de 2002 levantou a suspeita de que esta cepa estivesse se tornado endêmica na UTI-pediátrica. Infelizmente, não foram tipadas outras cepas de *K. pneumoniae* ESBL deste setor. Os mecanismos da transmissão inter-hospitalar não foram avaliados neste estudo. Sabe-se apenas que alguns componentes do corpo médico e de enfermagem atuavam na UTI-Neo do Hospital Evangélico e na UN do HURNP no período dos surtos.

A cultura obtida do paciente 10 após 50 dias da alta hospitalar, confirmada com o mesmo perfil I, alertou para a manutenção da resistência mediada por ESBL no ambiente extra-hospitalar. Resultados semelhantes foram observados por Einhorn et al (2002). Os autores acompanharam a epidemiologia de *E. coli* e *K. pneumoniae* ESBL em um hospital universitário de Chicago com 350 leitos e concluíram que, além da população de risco internada em hospitais e asilos, os pacientes ambulatoriais com doenças crônicas passaram a constituir uma nova população de risco, sendo capazes de albergar produtores de ESBL.

Segundo Borer et al (2002), a exemplo do que ocorreu com o *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina e o *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, a resistência mediada pela produção de ESBL vêm sendo descrita também entre pacientes comunitários. Os autores descreveram seis pacientes com bacteremia comunitária internados entre janeiro e agosto de 1997 em um centro médico do sul de Israel, totalizando 5% (6/119) de produtoras de ESBL, sendo: *K. pneumoniae* ESBL (n= 4), *E. coli* ESBL (n= 1)

e *Enterobacter* sp. (n= 1). Ko et al (2002) realizaram um estudo colaborativo mundial com 12 centros médicos, entre janeiro de 1996 e dezembro de 1997, que avaliou 455 episódios de bacteremia por *K. pneumoniae*. Dentre as 202 infecções comunitárias estudadas, 7 (3,5%) foram causadas por cepas de *K. pneumoniae* ESBL. Nenhum dos sete pacientes havia recebido recentemente cefalosporinas de terceira geração ou aztreonam, e em um caso foi possível excluir o contato prévio com ambientes hospitalares.

O perfil II foi descrito em cepas isoladas na UTI-Neo do Hospital Evangélico de Londrina em setembro de 2001. Portanto, contemporâneo ao surto da UN do HURNP. Foi possível identificar um grupo de três pacientes colonizados pela mesma cepa. O perfil III foi encontrado em isolados não produtores de ESBL, obtidos em sítios colonizados de três pacientes internados na UN do HURNP, denotando a transmissão horizontal de uma cepa a um grupo pequeno de pacientes, não caracterizando um surto, mas um *cluster* (BECK-SAGUE, JARVIS e MARTONE, 1997). O perfil IV representou uma cepa disseminada pelo HURNP, sendo duas obtidas da Enfermaria Masculina, em 19 de março (hemocultura) e 17 de junho de 2001 (urocultura), e a terceira de um paciente internado na UTI de adultos em 11 de março de 2002 (hemocultura). Deve-se ressaltar as características geográficas e temporais destes isolados, o que denota a manutenção da cepa em diferentes ambientes e durante um longo período (BRANGER et al, 1998). O perfil V agrupou dois isolados utilizados como controles, causadores do surto ocorrido na UN do HURNP em 1999 (OTMAN et al, 2002). Branger et al (1998) analisaram a correlação genética entre cepas de *K. pneumoniae* ESBL causadoras de um longo surto, ocorrido entre 1992 e 1994, com surtos anteriores deste mesmo agente em um hospital universitário francês. Os resultados obtidos pela tipagem com PFGE permitiram demonstrar a relação genética entre cepas epidêmicas dos diferentes surtos documentados, entretanto, apesar da manutenção da cepa epidêmica, o tipo da enzima ESBL produzida variou entre os surtos.

Os demais perfis, de VI a XIII, não puderam ser relacionados entre si e nem com os demais perfis definidos. Sendo, uma cepa do Hospital Evangélico de Londrina, cinco de unidades distintas do HURNP colhidas no período próximo ao surto da UN e duas colhidas na UN. Vale ressaltar o isolado 3125, obtido de hemocultura em 20 de agosto, juntamente com uma urocultura (3099) e uma cultura de ponta de cateter (3177), ambas produtoras de ESBL e classificadas como perfil I. Inicialmente, quando da definição da mesma espécie nos três materiais, suspeitou-se de uma sepse secundária. Entretanto, a definição de um antibiotipo diferente descartou tal possibilidade. A confirmação feita pela PFGE fez com que tal achado fosse computado como contaminação de coleta.

A tipagem pelo PFGE permitiu ainda detectar longos períodos de colonização pela cepa epidêmica. O paciente 4 apresentou oito cepas geneticamente relacionadas (perfil I), todas obtidas de sites colonizados no período de 29 de agosto a sete de novembro de 2001 (70 dias). O paciente 17 também apresentou longo período com a cepa epidêmica, entretanto, a colonização iniciada em seis de agosto se estendeu até 26 de setembro (51 dias), quando se diagnosticou uma infecção do acesso venoso pela mesma cepa, voltando a causar quadro de sepse no mês seguinte, em nove de novembro de 2001. A colonização persistente das mãos da auxiliar C pode ser documentada microbiologicamente no período de 12 de setembro a 21 de dezembro (100 dias), todas com o mesmo perfil I (Figura 20).

A presença de *K. pneumoniae* ESBL em pacientes recém nascidos deve ser tratada com seriedade. A fragilidade da população e as características do microrganismo promovem o desequilíbrio no binômio parasita-hospedeiro, favorecendo condições indesejadas que afetam o indivíduo, em quadros de infecções graves, e que podem se refletir coletivamente, caracterizando as situações de surto. Assim sendo, o estudo de surtos em UTI-Neo ilustra o modelo de prevenção e controle das infecções hospitalares. Neste estudo, além

do controle do surto, foi possível erradicar o agente. Evito-se que a *K. pneumoniae* ESBL se tornasse endêmica, o que constituiria um sério risco adicional para aquela população. Deve-se lembrar também que, além de definir fatores específicos de risco ou medidas de intervenção direcionadas, as ações de prevenção e controle devem ser múltiplas, focando o paciente e a qualidade da assistência em primeiro plano, permitindo a quebra da corrente de seleção de microrganismos resistentes e a disseminação das infecções hospitalares.

- A ampla investigação microbiológica e epidemiológica, incluindo a análise da epidemiologia molecular, permitiu definir o padrão de disseminação do surto na UN.
- A análise microbiológica de possíveis fontes exógenas não detectou a cepa epidêmica, deste modo, além dos pacientes, não se pode definir a existência de outros focos de contaminação.
- A definição do padrão clonal de disseminação, suspeitado inicialmente pela fenotipagem, foi ratificado pela genotipagem.
- As evidências apontaram para a disseminação via transmissão cruzada, mediada pelas mãos da equipe e intensificada pela contaminação de superfícies inanimadas, tendo os próprios pacientes como reservatórios.
- O conhecimento do modelo de disseminação fez com que, entre as medidas de intervenção, as medidas de barreira fossem intensificadas, alcançando a erradicação da cepa epidêmica na UN.
- A associação entre exposição a fatores considerados como risco para a aquisição da cepa epidêmica e o desenvolvimento de infecção ou colonização não pode ser demonstrado estatisticamente.
- Embora a relação direta entre causa e efeito possa ser discutida, certamente a intervenção colaborou com o desfecho observado no prazo relativamente curto de evolução do surto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-RABEA, A. A.; BURWEN, D. R.; ELDEEN, M. A. F. et al. *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in neonates in a hospital in the kingdom of Saudi Arabia. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 19, p. 674-679, 1998.

ASENSIO, A.; OLIVER, A.; GONZÁLEZ-DIEGO, P. et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 55-60, 2000.

AYAN, M.; KUZUCU, C.; DURMAZ, R. et al. Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 24, p. 495-500, 2003.

BABINI, G. S.; LIVERMORE, D. M. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 183-189, 2000.

BARTH, A.L. Establishing typing in a developing country. In: Curso sobre Tipagem Molecular com Ênfase na Técnica de Ribotipagem Automatizada. Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001

BECK-SAGUE, C.; JARVIS, W.R. e MARTONE, W.J. Outbreak investigations. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, p. 138-145, 1997.

BERNARDS, A. T.; FRÉNAY, H. M. E.; LIM, B.T. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*: an unexpected difference in epidemiologic behaviour. **American Journal of Infection Control**, v. 26, p. 544-551, 1998.

BERTHELOT, P.; GRATTARD, F.; PATRURAL, H. et al. Nosocomial colonization of premature babies with *Klebsiella oxytoca*: probable role of enteral feeding procedure in transmission and control of the outbreak with the use of gloves. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 22, p. 148-151, 2001.

BISSON, G.; FISHMAN, N. O.; PATEL, J. B. et al. Extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 23, p. 254-260, 2002.

BLAHOVA, J.; HUPKOVA, M.; KRALIKOVA, K. et al. Transfer of resistance to oxyimino-cefalosporins and of extended-spectrum beta-lactamase productions in *Klebsiella pneumoniae* strains from infected neonates. **Zentralbl Bakteriologie**, v. 288, p. 75-86, 1998.

BONTEN, M. J. M. e WEINSTEIN, R. A. The role of colonization in the pathogenesis of nosocomial infections. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 17, p. 193-200, 1996.

BORER, A.; GILAD, J.; MENASHE, G. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in community-acquired bacteremia in southern Israel. **Med Sci Monit**, v. 8, p. cr44-47, 2002.

BRANGER, C.; LESIMPLE, A.L.; BRUNEAU, B. et al. Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a university hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 201-209, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no Brasil. Portaria n. 2.616 de 12 de maio de 1998.

BURKE, J. P. Antibiotic resistance: closing the loop. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 433-436, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Laboratory capacity to detect antimicrobial resistance, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 48, p. 1167-1171, 2000.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Public health focus: Surveillance, prevention, and control of nosocomial infections. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 41, p. 783-787, 1992.

CENTRO BRASILEIRO DE CLASSIFICAÇÃO DE DOENÇAS, Centro Colaborador da OMS para a Classificação de Doenças em Português Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo/Organização Mundial de Saúde/Organização Pan-Americana de Saúde. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/cid10/webhelp/cid10.htm>. Acesso em 10 de dezembro de 2002.

CHAVES, J; LADUNA, M. G.; SEGURA, C. *et al.* SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2856-2861, 2001.

COOVADIA, Y.M.; JOHNSON, A. P.; BHANA, R.H. *et al.* Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. **Journal of Hospital Infection**, v. 22, p. 197-205, 1992.

COOVADIA, Y. M.; BHANA, R. H.; JOHNSON, A. P. *et al.* A laboratory confirmed outbreak of rifampin-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery. **Journal of Hospital Infection**, v. 14, p. 303-312, 1989.

EHRHARDT, A.F.; SANDERS, C.C.; THOMSON, K.S. *et al.* Emergence of resistance to imipenem in *Enterobacter* isolates masquerading as *Klebsiella pneumoniae* during therapy with imipenem/cilastatin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 120-122, 1992.

EINHORN, A.E.; NEUHAUSER, M.M; BEARDEN, D. T. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamases: frequency, risk factors, and outcomes. **Pharmacotherapy**, v. 22, p. 14-20, 2002.

EISEN, D.; RUSSEL, E. G.; TYMMS, M. *et al.* Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 713-717, 1995.

EVEILLARD, M.; EB, F.; TRAMIER, B. et al. Evaluation of the contribution of isolation precautions in prevention and control of multi-resistant bacteria in a teaching hospital.

Journal of Hospital Infection, v. 47, p. 116-124, 2001.

FARMER, J.J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: Murray, R.P. et al. -**Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed., American Society for Microbiology, 1999. 442-458.

FILE, T. M. Overview of resistance in the 1990's. **CHEST**, v. 115, p. 3s-8s, 1999.

FLIDEL-RIMON, O.; LEIBOVITZ, E.; JUSTER-REICHER, A. et al. An outbreak of antibiotic multiresistant *Klebsiella* at the Neonatal Intensive Care Unit, Kaplan Hospital, Rehovot, Israel, November 1991 to April 1992, **American Journal of Perinatology**, v 13, p. 99-102, 1996.

FILHO, J. R. C. Correlação epidemiológica, microbiologia e clínica das infecções hospitalares em unidades de terapia intensiva causadas por *Klebsiella pneumoniae*. 2003. Tese de Doutorado apresentado à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo.

FOCA, M.; JACOB, K.; WHITTIER, S. et al. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* infection in a neonatal intensive care unit. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 695-700, 2000.

FRIDKIN, S.K.; WELBEL, S.F. e WEINSTEIN, R.A. Magnitude and prevention of nosocomial infections in the intensive care unit. **Infection Diseases Clinic of North America**, v. 11, p. 479-496, 1997.

GAILLOT, O.; MARVEJOULD, C.; ABACHIN, E. et al. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1357-1360, 1998.

GARNER, J. S. Hospital infection control practices advisory committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 17, p. 53-80, 1996.

GARNER, J. S.; JARVIS, W. R.; EMORI, T. G. et al. Centers for Diseases Control and Prevention definitions for nosocomial infections. **American Journal of Infection Control**, v. 16, p. 128-140, 1988.

GAZOULI, M.; KAUFMANN, M. E.; TZELEPI, E. et al. Study of an outbreak of cefoxitin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 508-510, 1997.

GORDIS, L. Epidemiology. 2nd edition. Philadelphia. W.B. Saunders Company, 2001,

GRANZOW, J. W.; SMITH, J. W.; NICHOLS, R. L. et al. Evaluation of the protective value of hospital gowns against blood strike-through and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* penetration. **American Journal of Infection Control**, v. 26, p. 85-93, 1998.

GUPTA A. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit--*Klebsiella pneumoniae*. **Seminars in Perinatology**, v. 26, p. 340-345, 2002.

HACEK, D. M.; SURIANO, T.; NOSKIN, G.A. et al. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 111, p. 647-654, 1999.

HAMOUDA, T.; FOULON, T.; BEN-CHEIKH-MASMOUDI, A.; FENDRI, C.; BELHADJ, O.; BEN-MAHREZ, K. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 427-433, 2003.

HARBARTH, S. Nosocomial transmission of antibiotic-resistant microorganisms. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 437-442, 2001.

HAWKEY, P. The enemy within—hospital-acquired, antibiotic-resistant bacteria. **Microbiology Today**, v. 28, p. 7-9, 2001.

HERNANDÉZ, J. R.; PASCUAL, A. e CANTÓN, R. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 21, p. 77-82, 2003.

HERRUZO-CABRERA, R.; GARCIA-CABALERO, B.; MARTIN-MORENO, J. M. *et al.* Clinical assay of N-duopropenide alcohol solution on hand application in newborn and pediatric intensive care units: Control of outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a newborn intensive care unit with this measure. **American Journal of Infection Control**, 29(3): 162-167, 2001.

HOLMBERG, A. D. e SOLOMON, S. L. Health and economic impacts of antimicrobial resistance. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, p. 1065-1078, 1987

HOSPITAL INFECTION CONTROL ADVISORY COMMITTEE. Guidelines form isolation precautions in hospitals. **American Journal of Infection Control**, v. 24, p. 24-52, 1996.

HUDOME, S. M. e FISHER, M. C. Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 303-307, 2001.

JACOBY, G. A. Extended-spectrum b-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. **Infectious Diseases in Clinical North America**, v. 11, p. 875-887, 1997.

JARVIS, W.R. The epidemiology of colonization. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 17, p. 47-52, 1996.

JASNY, B. R. e BLOOM, F.E. It's not rocket science- but it can save lives. **Science**, v. 280, p. 1507, 1998.

- JEONG , S. H.; KIM, W. M.; CHANG, C. L. et al. Neonatal intensive care unit outbreak caused by a strain of *Klebsiella oxytoca* resistant to aztreonam due to overproduction of chromosomal beta-lactamases. **Journal of Hospital Infection**, v. 48, p. 281-188, 2001.
- JOHNSON, A. P. e WOODFORD, N. Plasmid analysis. In: _____. *Methods in molecular medicine. Molecular bacteriology: Protocols and clinical applications*. 2nd Ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 1998. v.15, cap. 4, p. 51-62.. Ed. N. Woodford and A. P. Johnson.
- KADO, C.I. e LIU, S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 145, p. 1365-1373, 1981.
- KO, W.C.; PATERSON, D.L.; SAGNIMENI, A.J. et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 160-166, 2002.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M., et al. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**, 5^a. ed., Mosbi, São Paulo, 2001.
- KRONTAL, S.; LEIBOVITZ, E.; GREENXWALD-MAIMON, M. et al. *Klebsiella* bacteremia in children in southern Israel (1988-1997). **Infection**, v. 30, p. 125-131, 2002.
- LIVERMORE, D. M. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, supl. D, p. 25-41, 1998.
- LUCET, J.C.; DECREÉ, D.; FICHELE, A. et al. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum b-lactamase-producing enterobacteriaceae in a university hospital. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1411-1418, 1999.
- MACKENZIE, F.M.; FORBES, K.J.; DORAI-JOHN, T. et al. Emergence of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **The Lancet**, v. 350, p783, 1997.
- MAKHOUL, I. R.; SUJOV, P.; ARDEKIAN, L. et al. Factors influencing oral colonization in premature infants. **Israel Medical Association Journal**, v. 4, p. 98-102, 2002.

MASLOW, J., MULLIGAN, M.E. Epidemiologic typing systems. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, p. 595-604, 1996.

McGOWAN, J. E. Economic impact of antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, 2001. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/414407>. Acesso em 20 de novembro de 2002.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24(suppl 1), p. s19-s45, 1997.

_____. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: extended-spectrum beta-lactamases have arrived in north america. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, p. 428-430, 1993.

MEYER, K.S.; URBAN, C.; EAGAN, J.A., et al. Nosocomial outbreak of *Klebsiella infection* resistant to late-generation cephalosporins. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, p. 353-358, 1993.

MONNET, D. L.; BIDDLE, J. W.; EDWARDS, J. R. et al. Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in United States, 1986 to 1993. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, p. 492-498, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement M100-S10. Wayne, PA, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement M100-S11. Wayne, PA, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement M100-S12. Wayne, PA, 2002.

NADJAR, D.; ROUVEAU, M.; VERDET, C. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type β -lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 187, p. 35-40, 2000.

NEUWIRTH, C.; SIEBOR, E.; LOPEZ, J. et al. Outbreak of TEM-24 producing *Enterobacter aerogenes* in an Intensive Care Unit and dissemination of the extended-spectrum β -lactamase to other members of the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 76-79, 1996.

NICOLLE, L.E. Infection control programmes to control antimicrobial resistance. **World Health Organization**. In: Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, 2001. Disponível em: http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/EGlobal_Strat.pdf. Acesso em: 8 março de 2002.

NICOLLETI, C. Controle de surto em berçário. In.: VIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 05 de setembro de 2002, Curitiba, PR. **Programa do VIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar**, 2002.

O'BRIEN, T. F. e STELLING, J.M. WHONET: removing obstacles to the full use of information about antimicrobial resistance. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 25, p. 163-168, 1996.

OELBERG, D. G.; JOYNER, S. E.; JIANG, X. et al. Detection of pathogen transmission in neonatal nurseries using DNA markers as surrogate indicators. **Pediatrics**, v. 105, p. 311-315, 2000.

OLIVE, D. M. e BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical Microbiology**, v.37, p. 1661-1669, 1999.

OTMAN, J.; CAVASSIN, E.D.; PERUGINI, M. R. E. e VIDOTO, M.C. An outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.23, n. 1, p. 1-2, 2002.

PALUCHA, A.; MIKIEWICZ, B.; HIZYNIEWICZ, W. *et al.* Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 489-499, 1999.

PATERSON, D. L. V.; KO, W.; GOTTBORG, A. V. *et al.* Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2206-2212, 2001.

PATTERSON, J. E.; HARDIN, T.C.; KELLY, C. *et al.* Association of antibiotic utilization measures and control of multiple drug resistance in extended-spectrum beta-lactamase-producing (ESBL) *Klebsiella pneumoniae*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, p. 455-458, 2000

PEÑA, C.; PUJOL, M.; ARDANUY, C. *et al.* Epidemiology and successful control of a large outbreak due *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 53-58, 1998.

PESSOA-SILVA, C. L.; MOREIRA, B. M.; ALMEIDA, V. C. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, p. 198-206, 2003.

PFALER, M.A.; HOLLIS, R.J. e SADER, H.S. Molecular Biology – PFGE Analysis of Chromosomal Restriction Fragments. Editor in chief: ISENBERG, H.D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**, Washington, ASM Press, p. 10.5.c.1-10.5.c.11, 1992.

PFALLER, M.A. Molecular approaches to the diagnosis and management of infectious diseases: Practicality and costs implications. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, p. 312-318, 2001.

PIROTH, L.; AUBÉ, H.; DOISE, J.-M.; et al. Spread of extended-spectrum beta-lactamase – producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value? **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 76-80, 1998.

PITOUT, J. D. D.; SANDERS, C. D. e SANDERS, W. E. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in Gram-negative bacilli. **American Journal of Medicine**, v. 103, p. 51-59, 1997.

PODSCHUN, R. e ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 589-603, 1998.

PRODINGER, W. M.; FILLE, M.; BAUERNFEIND, A. et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 b-lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 564-568, 1996.

RAHAL, J.J.; URBAN, C.; HORN, D. et al. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. **JAMA**, v. 280, p. 1233-1237, 1998.

REBUCK, J.A.; OLSEN, K.M.; FEY, P.D. et al. Characterization of an outbreak due to extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 1368-1372, 2000.

RICE, L.B.; WILLEY, S.H.; PAPANICOLAOU, G.A. et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum b-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 2193-2199, 1990.

ROSSOFF, L.J.; BORENSTEIN, M. e ISENBERG, H.D. Hand washing in the ICU. **Critical Care Medicine**, v. 23, p. 1211-1216, 1995.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A. et al. Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: summary of results from three years of the Sentry

Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 200-214, 2001.

SANDERS, W. E. e SANDERS, C. C. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 220-241, 1997.

_____. Beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 824-839, 1992.

SCHIAPPA, D.A.; HAYDEN, M. K.; MATUSHEK, M. G. et al. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiology investigation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p. 529-536, 1996.

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

SELNIKOVA, O.P.; PERSIDSKII, I.U.V.; BARSHTAIN, I.U.A. et al. The microbiological and pathomorphological characteristics of *Klebsiella* infection. **Mikrobiol Zh.** v. 54, p. 75-80, 1992.

SELDEN, R.; SHARON, L.; WANG, W. L. L. et al. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. **Annals of Internal Medicine**, v. 74, p. 657-664, 1971.

SILVA, J.; GATICA, R.; AGUILAR, C. et al. Outbreak of infection with extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3193-3196, 2001.

SIU, L. K.; LU, P.; HSUEH, P. et al. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4020-4027, 1999.

STRUELENS, M.J. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, p. 2-11, 1996.

STRUVE, C.; FORESTIER, C. e KROGFELT, K.A. Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. **Microbiology**, v. 149, p. 167-176, 2003.

SZABÓ, D.; FILETÓTH, Z.; SZENTRANDRÁSSY, J. *et al.* Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n. 12, p. 4167-4169.

TANG, Y.; PROCOP, G.W. e PERSING, D.H. Molecular diagnostics of infectious diseases. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 2021-2038, 1997.

TENOVER, F. C.; MOHAMMED, M. J.; GORTON, T. S. *et al* Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4065-4070, 1999.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D. e GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, p. 426-439, 1997)

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D. e GOERING, R.V. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

UCISA, Unidade de Controle de Infecção em Serviço de Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Comissões de Controle de Infecção Hospitalar no Brasil** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por emerson_danguy@yahoo.com.br em 19 de novembro de 2001.

VILLARI, P.; IACUZIO, L. e SCARCELLA, A. Molecular epidemiology as an effective tool in the surveillance of infections in the neonatal intensive care unit. **Journal of Infection**, v. 37, p. 327-381, 1998.

WEINSTEIN, R. A. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 188-192, 2001.

WIENER J.; QUINN, J. P.; BRADFORD, P. A. *et al.* . Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. **JAMA**, v.281, p. 517-523, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance. 2001. Disponível em:
<http://www.who.int/csr/drugresist/execsumE.pdf>. Acesso em: 05 de março de 2002.

9 APÊNDICE

APÊNDICE A- Instrumento utilizado na análise dos prontuários

Controle (n°)
 Colonizado (n°)
 Infectado (n°)

Prontuário n°: _____

1) Nome: _____ Idade gestacional: _____ Sexo: _____

2) Data nascimento: __/__/__ Peso ao nascer: _____ Diagnóstico ao nascer: _____

3) Boletim de Apgar: 1 minuto: _____ 5 minutos: _____ Normal () Cesáreo ()

4) Antecedentes obstétricos _____

5) Dias de internação na UN: _____

6) Data das culturas: _____

7) Exposição: Data de início-Data de término (dias)

Nutrição

parenteral: _____

Nutrição enteral: _____

Transfusão sanguínea: _____

Intubação: _____

CPAP: _____

Cateter urinário: _____

Cateter venoso (tipo): _____

Diálise: _____

Outros procedimentos invasivos: _____

Uso de antimicrobianos: _____

Uso de corticosteróides: _____

Cirurgias: _____

Infecção diagnosticada: _____

Outras observações: _____

8) Destino: Transferência () Alta () Óbito ()

ANEXO A- Comparação entre os pontos de corte usuais para as drogas chave em *Enterobacteriaceae* e para detecção de ESBL em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli*

Drogas chave	Critério válido para as <i>Enterobacteriaceae</i>		Critérios válidos para <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. oxytoca</i>	
	Método		Método	
	Disco difusão Sensível (mm) ^a	Quantitativo Sensível (µg/mL) ^b	Disco difusão Sensível (mm)	Quantitativo Sensível (µg/mL)
Aztreonam (30µg)	≥ 22	≤ 8	≥ 28	< 2
Cefotaxima (30µg)	≥ 23	≤ 8	≥ 28	< 2
Cefpodoxima (10µg)	≥ 21	≤ 8	≥ 23	< 2
Ceftazidima (30µg)	≥ 18	≤ 8	≥ 23	< 2
Ceftriaxona (30µg)	≥ 21	≤ 8	≥ 26	< 2

^amm, medida do halo de inibição em milímetros; ^bµg/mL, CIM em microgramas por mililitro

Fonte: NCCLS (2001)

ANEXO B- Interpretação do teste de confirmação de ESBL com tiras de Etest ESBL^R

Resultado	Interpretação	Condições
Teste positivo para ESBL	O resultado deve atender às condições (1) <u>OU</u> (2) <u>OU</u> (3)	(1) $CTX \geq 0,5$ <u>E</u> $CTX/CTX-CL \geq 8$ <u>OU</u> (2) $CAZ \geq 1,0$ <u>E</u> $CAZ/CAZ-CL \geq 8$ <u>OU</u> (3) Deformação da elipse formada com CTX ou CAZ, mesmo com baixos valores de CIM ($CTX < 0,5$ ou $CAZ < 1$)
Teste negativo para ESBL	O resultado deve atender às condições (1), (2) <u>E</u> (3) simultaneamente	(1) $CTX < 0,5$ <u>OU</u> $CTX/CTX-CL < 8$ <u>E</u> (2) $CAZ < 1,0$ <u>OU</u> $CAZ/CAZ-CL < 8$ <u>E</u> (3) Ausência de deformação na elipse formada com CTX <u>E</u> CAZ
Indeterminado para a produção de ESBL	Quando o resultado obtido se enquadrar em (1) <u>OU</u> (2)	(1) $CTX > 16$ <u>E</u> $CTX-CL > 1,0$ <u>OU</u> (2) $CAZ > 32$ <u>E</u> $CAZ-CL > 4,0$

CTX – cefotaxima

CAZ – ceftazidima

CTX-CL- cefotaxima-clavulanato

CAZ-CL – ceftazidima-clavulanato

Fonte: AB Biodisk, Solna, Suécia

ANEXO C- Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HURNP

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL DO NORTE DO PARANÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

OFÍCIO CEP 011/02

Londrina, 19 de março de 2002.

AO SR.
EMERSON DANGUY CAVASSIN
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA APLICADA, LEGISLAÇÃO E DEONTOLOGIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
N E S T A

Prezado Senhor,

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou e aprovou o Projeto de Pesquisa "SURTO DE INFECÇÃO HOSPITALAR CAUSADO POR KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUTORA DE ESBL EM UMA UTI-NEONATAL: ANÁLISE E MEDIDAS DE CONTROLE", do Bioquímico EMERSON DANGUY CAVASSIN, bem como o Termo de Compromisso que está de acordo com a Resolução 196/96

Atenciosamente,



Dr. Marcos Menezes Freitas de Campos
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenador

ANEXO D- Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da USP



Ofício CEP nº 10

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULOFaculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 10 de março de 2003.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 24 de fevereiro do corrente ano, **aprovou** o projeto "Surto de Infecção Hospitalar causado por *Klebsiella pneumoniae* Produtora de ESBL em uma UTI-Neonatal: Análise e Medidas de Controle", apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 28 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).
Emerson Danguy Cavassin
Orientador: Prof. Elsa Massae Mamizuka
FBC

Emerson Danguy Cavassin