

JULIANA BERTOLI DA SILVA

Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos, similaridade genética e adequação da terapia antimicrobiana em amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefalosporina de quarta geração isoladas em hemoculturas no Hospital São Paulo

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias

**São Paulo
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA BERTOLI DA SILVA

Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos, similaridade genética e adequação da terapia antimicrobiana em amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefalosporina de quarta geração isoladas em hemoculturas no Hospital São Paulo

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Pires Pereira

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

São Paulo
2005

SILVA, Juliana Bertoli

Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos, similaridade genética e adequação da terapia antimicrobiana em amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefalosporina de quarta geração isoladas em hemoculturas no Hospital São Paulo/ Juliana Bertoli da Silva.- - São Paulo, 2005.

xvi, 122f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**

Chefe do Departamento: Prof^a Dr^a Emília Inoue Sato

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

JULIANA BERTOLI DA SILVA

Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos, similaridade genética e adequação da terapia antimicrobiana em amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefalosporina de quarta geração isoladas em hemoculturas no Hospital São Paulo

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª Luci Corrêa

Profª Drª Maria Luiza Moretti

Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini

Profª Drª Maria Cristina Bronharo Tognim

Aprovada em: ____/____/____

“Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem o forte, na sua força, nem o rico, nas suas riquezas. O único motivo de orgulho deve ser me conhecer de fato, e saber que Eu sou o Senhor que mostra ao mundo o verdadeiro amor, a verdade e a justiça; porque destas coisas me agrado.”
(Jr 9.23,24.)

“Os que esperam no Senhor, renovarão suas forças, subirão com asas como águias, correrão, e não se cansarão, caminharão e não se fatigarão.” (Isaías 40. 31)

Dedico aos meus queridos pais, Tânia e José Roberto, e ao meu adorado irmão, Paulo Roberto, pela grandeza do seu amor, que sempre protegeu e iluminou meus caminhos, transformando dificuldades em desafios e tristezas em crescimento espiritual. Vocês são exemplos de coragem e sabedoria, e possuem meu mais verdadeiro e eterno amor. Muito Obrigada!!!

Ao meu amor Renato Arruda, que sempre procurou elevar o sentido de nossas vidas unindo o amor à amizade e à cumplicidade, e resgatando minhas forças e esperanças nos momentos mais difíceis. Querido, esta conquista também é sua!

Agradecimentos

A Deus e à Nossa Senhora que me guiam pelos melhores caminhos e me fornecem meios todos os dias para enxergar a grande preciosidade e beleza da vida.

Ao Prof^o. Dr^o. Antônio Carlos Campos Pignatari, por ter acreditado no meu trabalho, pela brilhante orientação e pela força amiga ao meu futuro profissional. Admiro-o por sua dedicação, determinação e honestidade.

Ao Rodrigo Elisandro Mendes e a Mariana Castanheira, excelentes colegas de trabalho e eternos amigos. Muito dos conhecimentos adquiridos, das oportunidades e das alegrias vividas no laboratório, eu devo a eles.

À amiga Rosana Capecce, profissional extremamente competente, dona de uma personalidade única e de um caráter invejável, é uma amiga muito querida, a quem devo boa parte desta conquista. Valeu, Rô!

À amiga Luciana Cirilo, que sempre me ajudou sem poupar esforços e me incentivou, como ninguém, para vencer os desafios e continuar lutando. Ela me presenteou com a mais pura e verdadeira amizade, da qual carregarei sempre comigo.

Às amigas do IDIPA, Dra Maria Antônia O. Machado, Agda, Ângela, Mirella, Renata e, especialmente, Adryella, a qual sempre me apoiou com a mais sincera amizade. Divertida e verdadeira, é a típica amiga que todos deveriam ter. Obrigada Dry!

À Andréa Santos Pereira, Deinha, um dos maiores tesouros do LEMC. Pequenina, mas com um coração enorme, está sempre pronta para ajudar. Ficarão para sempre na lembrança os inúmeros momentos que choramos, mas também, que rimos muito juntas.

À amiga Martha Rivero por fazer as horas de trabalho muito mais divertidas e pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis que passei no laboratório.

À amiga Jacira Donizetti pelo seu carinho e jeitinho único, e pelo seu trabalho que foi essencial na realização deste estudo.

À amiga Jussimara Monteiro, pela competência na realização da Ribotipagem das amostras avaliadas neste trabalho, e pelas divertidas horas que passamos no laboratório e em casa.

Às amigas Thaís A. Fernandes e Kelly Aline S. Santiago pela amizade, incentivo e carinho demonstrado durante a realização desta tese.

À Maria Cristina Tognim, Juliana Gugel, Liana Carballo Menezes, Andreia Penteado e Itacy Silva pelos descontraídos momentos que compartilhamos no LEMC.

Aos amigos Anderson F. Santos e Adriana Gianini, pelo companheirismo diário e por estarem sempre prontos a me ajudarem.

À Camila, Kátia, Elaine, Fabíola e Ana Lívia, amigas especiais que apesar de não estarem mais no laboratório, compartilharam momentos de luta, alegrias e tristezas.

À querida amiga Patrícia Masseti, pela maravilhosa convivência e pelo apoio em momentos decisivos da conclusão deste estudo. Uma pessoa muito especial, a quem serei sempre grata pelo carinho, compreensão e paciência. Sentirei saudades das nossas longas conversas e boas rizadas.

À minha amiga e confidente Marina Drummond, uma profissional excelente que foi enviada por Deus no momento que mais precisei. Ela me ensinou que “o verdadeiro sentido da vida é ser a gente mesma”. Serei eternamente grata pelo bem que ela me fez!

Aos professores e doutores da EPM, pelos ensinamentos e oportunidades e, a todas as outras pessoas que participaram direta ou indiretamente do meu trabalho, o meu sincero muito obrigada!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	VI
AGRADECIMENTOS.....	VII
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XV
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1– AGENTE ETIOLÓGICO	1
1.2 – IMPORTÂNCIA DAS INFECÇÕES POR <i>ENTEROBACTER</i> spp.....	2
1.3 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO <i>ENTEROBACTER</i> spp. AOS ANTIMICROBIANOS.....	5
1.4 – RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS.....	6
1.4.1 – <i>Mecanismos de resistência aos β-lactâmicos</i>	7
1.5 – RESISTÊNCIA A OUTROS ANTIMICROBIANOS E MULTIRRESISTÊNCIA	21
1.6 – TIPAGEM MOLECULAR	23
1.7 – PERFIL DO CONSUMO DE ANTIMICROBIANOS NO HOSPITAL SÃO PAULO.....	23
2 – OBJETIVOS.....	28
3 – MÉTODOS	29
3.1 – AMOSTRAS BACTERIANAS	29
3.2 – IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	29
3.3 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AOS ANTIMICROBIANOS.....	29
3.3.1 – <i>Preparo do inóculo bacteriano</i>	30
3.3.2 – <i>Etest</i> [®]	30
3.4 – DETECÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>ENTEROBACTER</i> spp. PRODUTORAS DE B-LACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL).....	31
3.4.1 – <i>Etest</i> [®] <i>ESBL screen</i>	31
3.5 – ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA DAS AMOSTRAS DE <i>ENTEROBACTER</i> spp. RESISTENTES À CEFEPIMA	32
3.5.1 – <i>Ribotipagem automatizada</i>	32
3.6 – DEFINIÇÕES.....	34
4 – RESULTADOS	36

4.1 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	37
4.2 – AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>ENTEROBACTER</i> spp. COM SENSIBILIDADE REDUZIDA AS CEFALOSPORINAS DE AMPLO ESPECTRO	39
4.3 – DETECÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE ESBL	41
4.4 – ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>ENTEROBACTER</i> spp. RESISTENTES À CEFEPIMA	43
4.5 – ANÁLISE DA ADEQUAÇÃO DA TERAPIA ANTIMICROBIANA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>ENTEROBACTER</i> spp. RESISTENTES À CEFEPIMA	45
5 – DISCUSSÃO	49
6 – CONCLUSÕES	71
7 – ANEXOS	73
8 – REFERÊNCIAS.....	78

ABSTRACT

Lista de Figuras

Figura 1 – Consumo das cefalosporinas em DDD médio no período de 1996 a 2001.....	27
Figura 2 – (a) zona “fantasma” de inibição abaixo do gradiente de concentração de cefepima é indicativo de ESBL. (b) deformação na elipse de inibição de cefepima também é indicativo de ESBL (adaptado do artigo de Stürenburg <i>et al.</i> , 2004).....	31
Figura 3 – Distribuição das 93 amostras de <i>Enterobacter</i> spp. de acordo com as diferentes unidades clínicas do Hospital São Paulo.....	36
Figura 4 – Distribuição em porcentagem das amostras de <i>Enterobacter</i> spp. sensíveis às cefalosporinas de amplo espectro de acordo com a unidade hospitalar.....	40
Figura 5 – Amostras de <i>Enterobacter cloacae</i> resistentes à cefepima com fenótipo negativo (a) e, com fenótipo positivo para a produção de ESBL. (b e c). PM – cefepima, PML – cefepima + ácido clavulânico.....	43
Figura 6 – Foto da Ribotipagem Automatizada caracterizando a similaridade genética entre os isolados de <i>Enterobacter</i> spp.....	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Diferenciação entre as espécies de <i>Enterobacter</i> spp. de importância clínica.....	2
Tabela 2 – Classificação esquemática das β -lactamases bacterianas.....	10
Tabela 3 – Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases.....	11
Tabela 4 – <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de β -lactamases AmpC induzível ^a	12
Tabela 5 – Consenso sobre o potencial de indução dos antimicrobianos em concentrações abaixo da MIC ^a dos microrganismos.....	13
Tabela 6 – Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de diversos agentes contra os 93 <i>Enterobacter</i> spp. isolados de hemoculturas no Hospital São Paulo.....	38
Tabela 7 – Comparação da sensibilidade antimicrobiana entre isolados de <i>Enterobacter</i> spp. sensíveis e com sensibilidade reduzida às cefalosporinas de amplo espectro.....	39
Tabela 8 – Frequência dos pacientes por idade e porcentagem de sensibilidade à ceftazidima e à cefepima de acordo com a faixa etária.....	41
Tabela 9 – Perfil de sensibilidade e resultado do teste fenotípico para ESBL dos isolados de <i>Enterobacter</i> spp. com sensibilidade reduzida à cefepima.....	42
Tabela 10 – Similaridade genética das amostras de <i>Enterobacter</i> spp. com sensibilidade reduzida à cefepima.....	44
Tabela 11 – Dados demográficos e clínicos dos pacientes com bacteremia por <i>Enterobacter</i> spp. com sensibilidade reduzida à cefepima e/ou teste fenotípico positivo para ESBL.....	47

Lista de Abreviaturas

- AK - Amicacina
- ATCC – *American type Culture Collection*
- CCIH – Comissão de controle de Infecção Hospitalar
- CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*
- CAZ - Ceftazidima
- CRO - Ceftriaxona
- DDD – Dose Diária Definida
- DNA – Ácido desoxirribonucléico (*desoxi-ribonucleic acid*)
- DNF – Doença não fatal
- DPF – Doença potencialmente fatal
- DRF – Doença rapidamente fatal
- ESBL – beta-lactamase de espectro ampliado (*extend spectrum beta-lactamase*)
- FEP - Cefepima
- HSP – Hospital São Paulo
- ICARE – *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*
- ICS – Infecção de corrente sanguínea
- IMP - Imipenem
- IOP – Instituto de Oncologia Pediátrica
- LEMC – Laboratório Especial de Microbiologia Clínica
- MDR – multirresistência (*Multi Drug Resistance*)
- MERO - Meropenem
- MIC – Concentração Inibitória Mínima (*Minimum Inhibitory Concentration*)
- MIC₅₀ – Concentração Inibitória Mínima para 50% das amostras
- MIC₉₀ – Concentração Inibitória Mínima para 90% das amostras
- NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
- NNIS – *National Nosocomial Infections Surveillance*
- OMP – Outer Membrane Protein
- OXA - Oxacilina
- PBP_s – proteínas ligadoras de penicilinas (*Penicillin binding protein*)
- PCR – Reação da polimerase em cadeia (*Polimerase chain reaction*)
- PM – Cefepima

PML – Cefepima + ácido clavulânico

POLI - Polimixina

RNA – Ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*)

SCOPE - *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance*

UFC – Unidades formadoras de colônias

UTI – Unidade de terapia intensiva

WHO – *World Health Organization*

Resumo

O *Enterobacter* spp. é um patógeno clinicamente importante em infecções de corrente sanguínea, e está frequentemente associado à resistência às cefalosporinas de amplo espectro. Neste microrganismo, a resistência geralmente ocorre devido à desrepressão do gene *ampC*, mas outros mecanismos de resistência também podem existir, como a produção de beta-lactamases de espectro ampliado mediada por plasmídios (ESBL), o que limita as opções da terapêutica antimicrobiana. **Objetivos:** A análise do perfil de sensibilidade, da resistência à cefalosporina de quarta geração, da similaridade genética, e da adequação da terapia antimicrobiana entre amostras de *Enterobacter* spp. isoladas em infecções de corrente sanguínea no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP, em 2003 e 2004. **Métodos:** Um total de 93 amostras de bacteremia, consecutivamente coletadas entre janeiro de 2003 e março de 2004, foram testadas quanto ao perfil de sensibilidade para 7 agentes antimicrobianos, utilizando a metodologia do Etest e, seguindo o procedimento para os testes de ágar difusão, descritos pelo NCCLS. Foram utilizadas fitas de Etest ESBL *screen* para a detecção de beta-lactamases de espectro ampliado nos isolados de *Enterobacter* spp.. As amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima foram selecionadas para a avaliação da similaridade genética através da ribotipagem automatizada, e os dados clínicos e demográficos dos pacientes com hemocultura positiva para esses isolados foram avaliados quanto a adequação da terapia antimicrobiana. **Resultados:** As taxas de resistência em *Enterobacter* spp. variaram de 28% para ceftazidima, 18,3% para cefotaxima e 12,9% para cefepima. O imipenem foi o antimicrobiano mais ativo (100% de sensibilidade), mesmo contra os isolados AmpC estavelmente desreprimidos. A ordem decrescente de atividade (% sensibilidade) contra os 93 isolados testados foi: imipenem (100%) >amicacina (86,0%) >cefepima (84,9%) = gatifloxacina (84,9%) >piperacilina/tazobactam (81,7%) >ceftazidima (72,0%) >cefotaxima (68,8%). Apenas 46,2% dos isolados de *Enterobacter* spp. resistentes à ceftazidima apresentaram sensibilidade à cefepima. A resistência cruzada com outros antimicrobianos foi comum entre as amostras resistentes à ceftazidima e àquelas resistentes à cefepima. A produção de ESBL foi encontrada em 5 isolados de *Enterobacter* spp.. Foram observados 7 ribotipos distintos entre as 14 amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima. Os pacientes com bacteremia por *Enterobacter* spp. resistente à cefepima, em sua maioria, possuíam doença de base potencialmente ou rapidamente fatal e

encontravam-se internados em unidades de terapia intensiva ou unidades cirúrgicas. Cinco entre 16 pacientes com bacteremia por *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida à cefepima receberam terapia antimicrobiana inicial apropriada. A taxa de mortalidade foi maior no grupo com terapia antimicrobiana empírica inadequada comparado aquele com terapia antimicrobiana adequada. **Conclusões:** Este estudo mostrou altas taxas de resistência à cefepima em *Enterobacter* spp. isolados de bacteremia, devido a presença de mecanismos adicionais de resistência além da produção de ESBL, e sugere que o uso prévio das cefalosporinas de amplo espectro pode estar relacionado com a emergência de isolados resistentes, e que a terapia antimicrobiana empírica inadequada pode estar associada a maior mortalidade entre esses pacientes. A grande variabilidade genética encontrada entre as amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima alerta à importância da política do uso apropriado dos agentes antimicrobianos, particularmente das cefalosporinas de amplo espectro, para restringir a seleção de isolados resistentes.

1 – INTRODUÇÃO

1.1– Agente Etiológico

Bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* constituem um dos principais grupos de microrganismos isolados de processos infecciosos. Estes organismos são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados no solo, água, plantas e como indica o nome da família, no trato intestinal dos seres humanos e dos animais. Alguns gêneros pertencentes a essa família são considerados patógenos primários, causando infecções até mesmo em indivíduos hígidos, enquanto outros acometem principalmente pacientes hospitalizados e imunocomprometidos (Koneman, 2001).

O gênero *Enterobacter* é constituído de bacilos Gram negativos móveis, com peritríquios e flagelos, e algumas espécies são encapsuladas. São anaeróbios facultativos, portanto capazes de fermentar a glicose e lactose como fontes de carbono, produzindo gás durante seu processo metabólico.

O gênero *Enterobacter* inclui 16 espécies e apresenta algumas características gerais de *Klebsiella*, mas suas espécies podem ser facilmente diferenciadas das espécies de *Klebsiella* por serem móveis, ornitina descarboxilase-positivas e urease negativas. Entre as espécies de importância clínica, encontram-se o *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, e *Enterobacter sakazakii*. Na tabela 1 estão incluídas as características bioquímicas pelas quais podem ser diferenciadas essas espécies. *Enterobacter taylorae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter asburiae* e *Enterobacter amnigenus* são raramente isolados de espécimes clínicas. Quatro outras espécies (*E. intermedius*, *E. dissolvens*, *E. nimipressuralis*, *E. pyrinus*) podem ser encontradas no ambiente ou como patógenos de plantas, mas ainda não foram isoladas de amostras biológicas humanas (Sanders & Sanders, 1997; Koneman, 2001).

Tabela 1– Diferenciação entre as espécies de *Enterobacter* spp. de importância clínica.

Prova Bioquímica	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. agglomerans</i> ^a
Lisina descarboxilase	+	-	-	-
Arginina diidrolase	-	+	+	-
Ornitina descarboxilase	+	+	+	-
Crescimento em KCN	+	+	+	Variável
Fermentação do D-sorbitol	+	+	-	Variável

^a Recentemente transferiu-se um dos biótipos de *E. agglomerans* para o gênero *Pantoea*.

E. aerogenes e *E. cloacae* são as espécies mais comumente isoladas de amostras biológicas. Encontram-se amplamente distribuídas na água, solo, esgoto e vegetal e fazem parte da microbiota entérica comensal. Estão associadas a uma variedade de infecções oportunistas que afetam as vias urinárias, o trato respiratório, as feridas cutâneas e podem causar septicemia e meningite (Koneman, 2001).

1.2 – Importância das infecções por *Enterobacter* spp.

As espécies de *Enterobacter* estão se tornando patógenos nosocomiais de crescente importância. Na era pré-antibiótica, eles não eram detectados como responsáveis por bacteremias hospitalares. Nos anos de 1970, estabeleceu-se que *Enterobacter* spp. pode ser um patógeno nosocomial, apesar de ser menos comumente encontrado que *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. (McGowan, 1988). Dados do *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS) mostram que *Enterobacter* spp. é responsável por 5 a 7% de todas as bacteremias nosocomiais nos Estados Unidos entre 1976 a 1989 (Jarvis *et al*, 1992), entretanto, a relevância do *Enterobacter* spp. como patógeno nosocomial tem se destacado nas publicações mais recentes do NNIS (NNIS, 1999). Os dados desse programa, de janeiro-1990 a maio-1999, mostram que a crescente importância desse microrganismo como patógeno hospitalar é mais aparente quando os isolados de unidades de terapia intensiva (UTIs) são considerados separadamente do hospital como um todo. Dados recentes mostram que o *Enterobacter* spp. foi o patógeno Gram negativo mais frequentemente isolado de bacteremias (4,9% de 21.943 isolados), o terceiro microrganismo mais comumente recuperado de infecções do trato respiratório inferior (11,2% de 39.810 isolados) e o sexto patógeno mais comum de infecções do trato urinário (5,1% de 30.701 isolados) em UTIs.

As análises dos dados do Programa de Vigilância de Resistência Antimicrobiana SENTRY, em hospitais da América Latina, corroboram com aqueles apresentados pelo Sistema NNIS. De acordo com o Programa SENTRY, o *Enterobacter* spp. foi responsável por 5,7% das bacteremias, 5,6% das infecções de pele e tecidos moles, 3,9% das infecções do trato urinário, 4,9% das infecções do trato respiratório inferior e 8,1% das infecções adquiridas em UTIs, estando entre os seis patógenos mais comumente isolados desses sítios infecciosos durante os 5 anos do estudo (1997 a 2001) (Sader *et al*, 2004). No Brasil, segundo dados desse mesmo programa, o *Enterobacter* spp. foi a quarta causa mais freqüente de infecções urinárias e o quinto patógeno mais comum em infecções da corrente sangüínea, infecções do trato respiratório superior e infecções de ferida cirúrgica no período de 1997 a 1999 (Sader, 2001).

Dados fornecidos pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital São Paulo/ UNIFESP mostram que, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2001, o *Enterobacter* spp. foi o quarto microrganismo mais isolado em infecções hospitalares. Em primeiro lugar, ficou a *Pseudomonas aeruginosa*, em segundo, o *Acinetobacter baumannii*, em terceiro, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus coagulase negativa* e, em quinto lugar, o *Staphylococcus aureus*.

Apesar de ocorrerem infecções adquiridas na comunidade por *Enterobacter* spp., a grande maioria das infecções por esse microrganismo é nosocomial. Pacientes com risco aumentado de se infectarem por *Enterobacter* spp. são aqueles com internação hospitalar prolongada, presença de doença de base grave, imunossupressão, prematuridade ou baixo peso ao nascer, presença de cateteres (cateter venoso central, tubo endotraqueal, cateter urinário) e, principalmente, uso prévio de antimicrobianos, especialmente, cefalosporinas de amplo espectro (Sanders & Sanders, 1997; Lee *et al.*, 2002).

As infecções por *Enterobacter* podem ser adquiridas por fontes endógenas e exógenas. Várias espécies podem ser encontradas nas fezes de humanos e animais, na água, plantas e insetos. Surtos por esse patógeno são freqüentemente reportados em unidades pediátricas, unidades de terapia intensiva, unidades de queimados e unidades oncológicas e, geralmente, estão relacionados com soluções intravenosas contaminadas, derivados do sangue, água destilada, endoscópios, mãos de profissionais de saúde, água para hidroterapia, estetoscópios, swabs de algodão,

soluções lipídicas e instrumentos usados para monitorar a pressão intra-arterial (Maki *et al.*, 1996). Contudo a maioria das infecções nosocomiais por *Enterobacter* spp. parece surgir de sítios endógenos previamente colonizados do próprio paciente. Colonização do trato gastrointestinal e de outros sítios do organismo com *Enterobacter* spp. ocorre freqüentemente nos pacientes gravemente acometidos, especialmente aqueles com terapia antimicrobiana prévia, portanto, debilidade severa associada aos efeitos supressivos dos antibióticos na microbiota proporciona uma excelente oportunidade para colonização por *Enterobacter* spp.. Essa colonização geralmente precede a infecção no organismo (Sanders & Sanders, 1997).

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *Enterobacter* spp. incluem penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, aztreonam, carbapenens e fluorquinolonas. Aminoglicosídeos são freqüentemente utilizados em regimes combinados aos β -lactâmicos na tentativa de se evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana. A monoterapia com esses agentes é raramente utilizada (Hardman, 2000).

Entre as opções terapêuticas atuais, as cefalosporinas de quarta geração (cefepima e cefpiroma) são potentes antimicrobianos contra bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive as cepas multirresistentes de Enterobactérias, como o *Enterobacter* spp. produtores de β -lactamases do tipo AmpC (resistentes às cefalosporinas de terceira geração).

O amplo espectro de atividade da cefepima se deve à sua baixa afinidade a muitas β -lactamases (especialmente grupo 1 Bush), à permeabilidade aumentada na membrana externa quando comparada às cefalosporinas de terceira geração (5 a 6 vezes maior), à alta afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina e à sua estrutura característica, a qual contém um grupamento quaternário de amônia na posição C-3' do núcleo da cefalosporina. A cefepima tem pólos positivo e negativo na molécula (*zwitterions*), uma propriedade que favorece a penetração da mesma através da parede do microrganismo (Sader & Jones; 1995; Jones, 1998).

Outros agentes de escolha para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias com sensibilidade reduzidas às cefalosporinas são os carbapenens, os quais são potentes antimicrobianos utilizados devido à elevada estabilidade desses compostos frente à hidrólise por grande parte das β -lactamases e, também, por

apresentarem alta capacidade de penetração pela membrana externa bacteriana (Senda *et al.* 1996; Yano *et al.*, 2001).

1.3 – Avaliação da sensibilidade do

aerogenes, enquanto o sulfametoxazol-trimetoprim possui atividade variável (Sanders & Sanders, 1997).

1.4 – Resistência aos β -lactâmicos

As taxas de resistência antimicrobiana em organismos Gram-negativos adquiridos em hospitais têm aumentado significativamente nas últimas décadas (NNIS, 1996; NNIS, 1999). Em estudos recentes, 25,3 – 36,4% dos *Enterobacter* spp. isolados de UTIs na Europa e nos EUA são resistentes às cefalosporinas de terceira geração (NNIS, 1999; ICARE_NNIS, 1999; Fluit *et al.*, 2001). Dados do SENTRY mostram 36% de resistência à ceftazidima por esse patógeno na América Latina, chegando a 42,9% de resistência em infecções do trato respiratório inferior no Brasil (Sader, 2004). Neste mesmo estudo, a cefepima (84,9 – 96,6% de sensibilidade) e os carbapenens (92,9 – 100% de sensibilidade), imipenem e meropenem, mantiveram-se com boa atividade contra isolados de *E. cloacae* e de outros patógenos dos hospitais avaliados pelo programa SENTRY.

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos é freqüentemente mediada pela hiperprodução de β -lactamases cromossomais induzíveis do tipo AmpC. Isolados de *Enterobacter* spp., inicialmente, podem se apresentar sensíveis aos β -lactâmicos *in vitro*, mas a resistência ocorre durante a terapia devido ao aumento da produção de β -lactamases. A emergência de isolados resistentes às cefalosporinas de terceira geração durante o tratamento das infecções de corrente sanguínea por *Enterobacter* spp. ocorre em aproximadamente 19% dos pacientes tratados com esses antimicrobianos (Kaye *et al.*, 2001).

Infecções causadas por bactérias multirresistentes estão relacionadas a uma maior morbi-mortalidade, hospitalização prolongada, e aumento importante no custo da internação, comparadas às infecções causadas por microrganismos sensíveis. Um estudo de coorte realizado por Cosgrove e colaboradores (2002), num hospital universitário terciário em Boston/EUA, demonstrou que a emergência de resistência às cefalosporinas de terceira geração em *Enterobacter* spp. estava associada ao aumento na mortalidade, nos dias de internação e nos gastos hospitalares. Os pacientes com infecção por *Enterobacter* spp. resistente permaneceram internados em média 9 dias a mais que os pacientes controles e o custo hospitalar médio por paciente caso foi \$29.379 mais elevado que o custo hospitalar médio por paciente controle.

Alguns estudos relatam redução na sensibilidade à cefepima em *Enterobacter* spp. e investigam os mecanismos responsáveis pela resistência a esta droga (Pidcock & Traynor, 1991; Charrel *et al.*, 1996; Fung-Tomc *et al.*, 1996; Tzelepi *et al.*, 2000; Cantón *et al.*, 2002; Arpin *et al.*, 2003; Aibinu *et al.*, 2003; Bell *et al.*, 2003; Barnaud, 2004). No entanto, há necessidade de maiores estudos que avaliem os fatores de risco relacionados à resistência do *Enterobacter* spp. às cefalosporinas de quarta geração e demonstrem o custo-efetividade da utilização desse antimicrobiano na terapia das infecções por esse patógeno.

1.4.1 – Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

As taxas de resistência bacteriana estão intimamente relacionadas à maneira como os agentes antimicrobianos são utilizados em um determinado ambiente. Bactérias naturalmente resistentes podem ser selecionadas durante o uso de determinados antimicrobianos, levando à falência clínica. Além disso, genes que codificam a resistência antimicrobiana podem ser adquiridos de outras bactérias (Livermore, 1991; Sanders & Sanders, 1992).

Os β -lactâmicos são os agentes antimicrobianos mais freqüentemente utilizados na prática médica. A resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos pode estar relacionada com qualquer uma das etapas envolvidas no mecanismo de ação desses antimicrobianos, ou seja, a síntese da parede celular bacteriana (Sanders & Sanders, 1992). Três mecanismos básicos de resistência aos β -lactâmicos têm sido descritos: i) alteração do sítio de ligação que, no caso, seriam as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs); ii) alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana; iii) degradação da droga através da produção de β -lactamases.

A afinidade dos agentes antimicrobianos às diversas PBPs é variável. Mutações podem alterar PBPs pré-existentes, que passam a apresentar baixa afinidade de ligação aos β -lactâmicos, ou levar à produção de PBPs suplementares que passam a apresentar baixa afinidade aos β -lactâmicos e são capazes de substituir as PBPs que se encontram inibidas. Essas PBPs “resistentes” não permitem a ligação do β -lactâmico que, dessa forma, não poderá atuar. A alteração das PBPs, levando à resistência aos β -lactâmicos, ocorre mais freqüentemente em bactérias como estafilococos, enterococos, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Livermore, 1991; Sanders & Sanders, 1992).

A alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana constitui um mecanismo de resistência nas bactérias Gram-negativas. A impermeabilidade da membrana externa ocorre quando bactérias mutantes passam a não produzir os habituais canais da membrana externa bacteriana (porinas), locais por onde penetram os β -lactâmicos (Nikaido, 1989; Nikaido, 1994). Esse mecanismo de resistência é mais comumente observado entre amostras de *P. aeruginosa* e bacilos Gram-negativos fastidiosos (Nikaido, 1989). Em enterobactérias, no entanto, os relatos de mutantes deficientes de porinas são mais raros.

A impermeabilidade da membrana externa é um dos poucos mecanismos de resistência bacteriana no qual uma alteração estrutural pode conferir resistência às diversas classes de antimicrobianos (Livermore, 1991). Entretanto, o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos é decorrente da produção de β -lactamases (Garau, 1994).

Produção de enzimas que catalisam a hidrólise dos β -lactâmicos

As β -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando, assim, a sua atividade antimicrobiana. A resistência ao antimicrobiano β -lactâmico irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolizar o antimicrobiano em questão e da velocidade com que o β -lactâmico penetra pela membrana externa. As β -lactamases são produzidas por inúmeras espécies bacterianas, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, porém com diversidades estruturais e localizações diferentes. Nas bactérias Gram-positivas, as β -lactamases são secretadas para o meio extracelular e, dessa forma são menos ativas que as β -lactamases produzidas pelas bactérias Gram-negativas. Nos microrganismos Gram-negativos, as β -lactamases encontram-se estrategicamente situadas no espaço periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agir de modo mais eficaz sobre os antimicrobianos β -lactâmicos antes desses atingirem o seu alvo de ação, as PBPs (Livermore, 1993). Algumas β -lactamases utilizam íons zinco como cofatores enzimáticos, enquanto a grande maioria opera via produção de ésteres de serina (Livermore, 1995).

O sinal para a codificação das β -lactamases pode estar localizado no DNA cromossômico, ou no DNA extracromossômico (plasmídeos e transposons) bacteriano (Livermore, 1991; Livermore, 1993).

Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens podem ser hidrolisados por vários membros da família das enzimas β -lactamases, resultando em compostos inativos microbiologicamente (Bush, 2001).

Desde a década de 70, quando foram identificadas as primeiras β -lactamases, houve a preocupação entre os pesquisadores em estabelecer uma classificação para essas enzimas. A primeira classificação fenotípica amplamente aceita foi aquela proposta em 1973 por Richmond & Sykes, que dividiram as β -lactamases conhecidas, até aquele momento, em cinco grandes grupos (I,II, III, IV e V), baseados no perfil enzimático (Richmond & Sykes, 1973). A utilização do ponto isoelétrico foi anexada à primeira proposta principalmente para diferenciação das β -lactamases mediadas por plasmídios (Sykes & Matthew, 1976). Na década de 80, duas outras classificações assumiram importância: i) MITSUHASHI & INOUE (1981), ii) BUSH (1989). A classificação de BUSH (1989) foi a primeira a correlacionar o substrato preferencial e propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima (Bush, 1989).

Em 1980, AMBLER propôs a classificação molecular das β -lactamases de acordo com a seqüência de aminoácidos das enzimas. Assim foram categorizadas quatro classes moleculares distintas (Ambler, 1980).

Uma série de novas β -lactamases tem sido descoberta, mas ainda a classificação mais utilizada é aquela proposta por Bush, Jacoby e Medeiros em 1995 (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995), que é uma versão mais atualizada da classificação anterior proposta por Bush em 1989. Essa classificação é bastante aceita e combina as características estruturais e funcionais das β -lactamases e, como pode ser observado na Tabela 2, divide essas enzimas em quatro grupos. Com o advento de novas e importantes enzimas, Bush, em 2001, adaptou sua classificação anterior adicionando à mesma a principal forma de aquisição dos genes codificadores das β -lactamases (Bush, 2001). Uma nova versão dessa classificação é apresentada na Tabela 3.

Tabela 2 – Classificação esquemática das β -lactamases bacterianas.

Bush, Jacoby, Medeiros	Bush	Rychmond & Sykes	Mitsuashi & Inoue	Classe Molecular	Substratos enzimáticos preferenciais	Inibição pelos inibidores de β -lactamases		Enzimas representativas
						Ác. Clav.	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC (Bactérias gram-negativas)
2 ^a	2a	N.I.	PCase V	A	Penicilinas	+	-	PCases gram-positivas
2b	2b	III	PCase I	A	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	N.I.	CXase	A	Penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactams	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	N.I.	N.I.	N.I.	A	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicilinas (carbenicilina)	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, III	D	Penicilinas (cloxacilina)	+/-	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	2e	Ic	CXase	A	Cefalosporinas	+	-	CSases induzíveis do <i>Proteus vulgaris</i>
2f	N.I.	N.I.	N.I.	A	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenens	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i> (NMC-A), <i>Serratia marcescens</i> (Sme-1)
3	3	N.I.	N.I.	B	Majoria dos β -lactâmicos + carbapenens	-	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (L1), <i>Bacteriodes fragilis</i> (Ccra)
4	4	N.I.	N.I.	N.D.	Penicilinas	-	?	PCase - <i>Burkholderia cepacia</i>

Abreviaturas: CSase, cefalosporinase; PCase, penicilinase; CXase, cefalosporinase que hidrolisa a cefuroxima; N.I. não incluída; N.D., não determinada; Ác. Clav., ácido clavulânico. (Adaptado do artigo de BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995)

Tabela 3 – Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases.

Grupo Funcional	Sub-grupos	Classe molecular	Características funcionais	Nº estimado de enzimas conhecidas	
				1995	2000
1		C	Enzimas freqüentemente cromossomais em BGN, mas podem ser codificados por plasmídios. Conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenens (exceto quando combinado com alteração porinas). Não são inibidas por ácido clavulânico.	32	51
2		A e D	Grande maioria das enzimas é inibida por ácido clavulânico	136	256
	2 ^a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.. Conferem altos níveis de resistência às penicilinas	20	23
	2b	A	β -lactamases de espectro reduzido de bactérias Gram negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1	16	16
	2be	A	ESBL conferem resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	36	119
	2br	A	β -lactamases derivadas da TEM resistentes ao inibidor de β -lactamases (IRT)	9	24
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina	15	19
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); pouco inibidas pelo ácido clavulânico	18	31
	2e	A	cefalosporinase inibidas por ácido clavulânico	19	20
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina, inibidas por ácido clavulânico	3	4
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros β -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico	13	24
4		ND	Enzimas não seqüenciadas que não se encaixam em outros grupos	7	9

Abreviatura: N.D., não determinada (Adaptado do artigo de Bush, 2001).

As espécies de *Enterobacter* destacam-se junto a outras bactérias produtoras de β -lactamases cromossomal do grupo 1 de Bush (Tabela 4). Nas cepas de *E. agglomerans* e *E. gergoviae* e alguns isolados de *E. sakazakii*, a enzima é produzida em níveis muito baixos e não induzíveis. Isso explica a grande susceptibilidade dessas espécies à ampicilina, cefalosporinas antigas e cefoxitina. A resistência natural a esses agentes é encontrada nos isolados de *E. taylorae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. asburiae* e algumas cepas de *E. sakazakii*, em geral, devido à presença das β -

lactamases cromossomal induzível do grupo 1 de Bush. Nas cepas selvagens dessas espécies, essa resistência aparece pela alta afinidade da droga à enzima ou em função do antimicrobiano agir como indutor da produção da β -lactamase, a qual hidroliza a droga mais eficientemente após a indução. A resistência às penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, inclusive das associações com inibidores de β -lactamases, e aztreonam emerge nas espécies de *Enterobacter* após mutação cromossomal do gene *ampD* que, normalmente, previne altos níveis de expressão dessas β -lactamases cromossomal. As proteínas AmpD, AmpG, e AmpR têm sido descritas no envolvimento da indução das β -lactamases da classe C (Jacobs *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1995; Normark, 1995; Park, 1995).

Tabela 4 – *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases AmpC induzível^a

Gênero	Espécies
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes, cloacae, sakazakii</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>
<i>Providencia</i>	<i>rettgeri, stuartii</i>

^aOutras espécies (não *Enterobacteriaceae*) com gene AmpC: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sóbria*, *Chromobacterium violaceum*, e *Rhodobacter sphaeroides* (Adaptado do artigo de Jones, 1998).

AmpD é uma recente N-acetilmuramil-L-alanina amidase que participa na reciclagem intercelular dos fragmentos de peptídeooglicano. A AmpD degrada o tripeptídeo 1,6-anhidro-N-acetilmuramil (tripeptídeo 1,6-anhMurNac) para liberar o tripeptídeo L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelic ácido (meso-DAP) para direta utilização na construção de novos peptídeooglicanos. Mutação no gene *ampD* que resulta na expressão de β -lactamases, mesmo na ausência de um indutor, coincide com o acúmulo do tripeptídeo 1,6-anhMurNac (Jacobs *et al.*, 1995). A conseqüente inativação da proteína AmpD leva a uma hiperprodução semiconstitutiva ou induzida de AmpC em *Enterobacter* spp. Em contrapartida, AmpD-mutantes com níveis elevados de expressão de β -lactamases mostram um dos três fenótipos conhecidos (hiperinduzido, desreprimido e parcialmente desreprimido), os quais estão associados a diferentes mutações ou, talvez, dependam da regulação de genes desconhecidos (Stapleton *et al.*, 1995a).

AmpG é uma proteína transmembrana envolvida na permeabilidade do tripeptídeo N-acetilglucosamina(GluNac)-1,6-anhMurNac . Dietz e colaboradores relataram que a AmpG primariamente afeta o D-pentapeptídeo (pentapeptídeo dissacarídico; GluNac-1,6-anhMurNac-L-Ala–D-Glu-meso-Dap-D-Ala-D-Ala), um muopeptídeo periplasmático que é convertido em uma molécula sinalizadora citoplasmática para indução de β -lactamases. Sem o gene *ampG*, não é possível a indução, nem tão pouco os altos níveis de expressão de β -lactamases (Korfmann & Sanders, 1989; Dietz *et al.*, 1997).

A proteína AmpR atua como um ativador transcricional ligando-se a regiões do DNA localizadas imediatamente acima (*upstream*) da região promotora do gene *ampC* (Bartowsky & Normark, 1993). Na ausência de um β -lactâmico indutor, AmpR reprime a síntese de β -lactamases em 2,5 vezes, enquanto que, na presença da droga, a expressão é induzida de 10 a 200 vezes (Lindberg & Normark, 1987).

Alguns β -lactâmicos, como a cefoxitina e o imipenem, são potentes agentes indutores, podendo aumentar de 100 a 600 vezes a expressão das β -lactamases (Stapleton *et al.*, 1995b; Jones, 1998). Sanders e colaboradores (1997) demonstram que a principal diferença entre os fortes e fracos indutores está na afinidade pelas

A frequência de mutações que leva à produção de β -lactamases AmpC desreprimidas em uma população bacteriana é em torno de 10^{-5} / UFC (Livermore, 1995). Kuga e colaboradores (2000) demonstraram a facilidade da seleção de mutantes AmpR numa frequência de 10^{-6} em *Enterobacter cloacae*, sugerindo fortemente que as cepas desreprimidas, tanto como mutantes AmpD ou AmpR, podem emergir frequentemente na clínica.

As β -lactamases do grupo 1 de Bush são inibidas competitivamente por cloxacilina, mas não por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Vários penems, carbapenems e monobactâmicos inibem β -lactamases AmpC, todavia nenhum desses inibidores encontra-se disponível comercialmente (Babini & Livermore, 2000). Entre esses compostos, destaca-se o Syn 2190 que apresenta o núcleo 1,5 dihidroxi-4-piridon no carbono 3 do anel monobactâmico e que inibe exclusivamente β -lactamases AmpC (Babini & Livermore, 2000; Danes *et al.*, 2002).

Um fato preocupante na última década foi a descoberta dos genes que codificam para as β -lactamases AmpC em plasmídios. Esses plasmídios são divididos em 4 grandes grupos (Rice & Bonomo, 2000) O grupo 1 consiste em genes originados da AmpC cromossomal de *C. freundii* (BIL-1, CMY-2, LAT-1, e LAT-2). Membros do grupo 2 estão relacionados com as cefalosporinases cromossomais de *E. cloacae* (MIR-1 e ACT-1); membros do grupo 3 estão relacionados com a AmpC da *P. aeruginosa* (CMY-1, FOX-1, e MOX-1); membros do grupo 4 estão associados às β -lactamases CMY-1 (*cluster* CMY-1). As β -lactamases do tipo AmpC mediadas por plasmídio têm sido descritas em muitas bactérias Gram-negativas em todo o mundo. Essas enzimas são mais frequentemente encontradas em *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *Salmonella* spp. (*serovars seftenberg e enteritidis*), *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, e *Klebsiella oxytoca*. A perda de porina em isolados clínicos com plasmídios que carregam genes de β -lactamases AmpC pode resultar em resistência aos carbapenems (Bradford *et al.*, 1997; Stapleton *et al.*, 1999).

A aquisição de genes AmpC plasmidiais em *K. pneumoniae* e *E. coli* foi inicialmente descrita em 1989, mas apenas recentemente sua ocorrência em amostras hospitalares dos Estados Unidos tem sido publicada (Moland *et al.*, 2002; Coudron *et al.*, 2003). Alvarez e colaboradores (2004) avaliaram a transmissibilidade da resistência à ceftazidima e a natureza das β -lactamases AmpC plasmidiais envolvidas em 752

amostras resistentes de 25 estados norte americanos. Eles reportaram a ocorrência dessas enzimas em 8,5% dos isolados de *K. pneumoniae*, 6,9%, das *K. oxytoca*, e 4% em *E. coli*. As β -lactamases AmpC envolvidas eram do tipo ACT-1, FOX-5, CMY-2 e DHA-1.

A hiperprodução de β -lactamases AmpC confere resistência às cefalosporinas de espectro ampliado, exceto cefepima e cefpiroma. Esses antibióticos entram rapidamente na célula bacteriana e têm uma alta afinidade pelas PBPs, entretanto altos níveis de resistência à cefepima ($MIC \geq 32 \mu\text{g/mL}$) têm sido encontrados em isolados clínicos, nos quais a hiperprodução de cefalosporinase AmpC foi combinada à deficiência de porinas (Piddock & Traynor, 1991; Charrel *et al*, 1996; Fung-Tomc *et al.*, 1996).

Um novo mecanismo de resistência à cefepima, envolvendo mudanças na estrutura da cefalosporinase AmpC, foi recentemente demonstrado que oKnte)aeacte

lactamases estudado mundialmente. Essas enzimas são a maior causa de resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos e têm sido motivo de extensivas investigações microbiológicas, bioquímicas, genéticas e epidemiológicas (Casellas, 1994; Bush *et al.*, 1995; Gales *et al.*, 1997).

Os genes que codificam ESBL estão localizados em grandes plasmídeos capazes de conferir multirresistência e são mais encontrados em *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* (Philippon *et al.*, 1989; Jacoby & Medeiros, 1991), porém outras bd

As β -lactamases capazes de hidrolisar carbapenens incluem uma das mais recentes classes descritas. Essas enzimas são responsáveis por conferir resistência aos carbapenens, a classe de β -lactâmicos com o maior espectro de atividade antibacteriana. A maioria dessas β -lactamases confere resistência não só aos carbapenens, mas também aos outros β -lactâmicos.

Vários estudos têm tentado descrever as propriedades dessas enzimas, contudo, a maior parte delas possui grande diversidade genética e bioquímica o que acarreta problemas de classificação. Essas enzimas podem pertencer fundamentalmente a dois grupos distintos: a) Classe molecular A, segundo a classificação de Ambler (1980), ou grupo 2f, segundo a classificação de Bush, Jacoby, Medeiros (1995) e b) Classe molecular B, segundo a classificação de Ambler (1980), ou grupo 3, segundo a classificação de Bush, Jacoby, Medeiros (1995).

Poucas enzimas pertencentes à classe molecular A ou grupo 2 têm sido reportadas em enterobactérias. Essas enzimas são inibidas por ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. As seguintes enzimas foram descritas: NMC-A em *Enterobacter cloacae* (Nordmann *et al.*, 1993), SME-1 em *Serratia marcescens* (Yang *et al.*, 1990), SME-2 e SME-3 (Queenan *et al.*, 2000), IMI-1 em *Enterobacter cloacae* (Rasmussen *et al.*, 1996), KPC-1 em *Klebsiella pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001).

NMC-A foi a primeira carbapenemase da classe A identificada de um isolado clínico de *Enterobacter cloacae*, NOR-1, em 1990. Essa enzima apresenta sensibilidade reduzida a imipenem, aztreonam, e menos para meropenem, enquanto permanece sensível às cefalosporinas de espectro ampliado. O gene de NMC-A é cromossomal e sua expressão é induzível. O gene *bla*_{NMC-A} é precedido por um gene regulatório tipo LysR, o NMC-R, semelhante àquele encontrado acima dos genes que codificam as cefalosporinases do tipo AmpC. O NMC-R aumenta a biosíntese da enzima a um estado basal e pode elevar ainda mais a produção em presença de um β -lactâmico indutor. Substituições nucleotídicas no gene *ampD* podem co-regular e levar a co-expressão estável da carbapenemase NMC-A junto à hiperexpressão da enzima AmpC de *E. cloacae* (Naas *et al.*, 2001).

Apesar da maioria dessas enzimas serem cromossômicas, a possibilidade de plasmídios ou integrons incorporarem a parte do DNA cromossômico que contenha tais

genes de resistência preocupa muito a comunidade científica, devido à grande chance desses plasmídios se disseminarem para bactérias de espécies distintas.

Na classe molecular B ou grupo 3, encontram-se as metalo- β -lactamases que foram descobertas há mais de 40 anos em uma amostra de *Bacillus cereus*. Os genes que codificam essas enzimas são geralmente cromossomais, mas podem também ser encontrados em plasmídios (Bush, 1998). As enzimas da classe B são as únicas a terem íons zinco no seu sítio ativo, ou seja, sua atividade catalítica depende desses íons. Além disso, essas enzimas somente são inibidas por EDTA ou compostos derivados do ácido tiolático, como, por exemplo, o ácido 2-mercaptopropiônico, e não por inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam.

Alguns pesquisadores dividem o grupo 3 em três grupos funcionais: 3a, 3b e 3c. No subgrupo 3a estão as enzimas que hidrolisam penicilinas tão ou mais rápido que imipenem. As cefalosporinas são usualmente hidrolisadas mais lentamente que o imipenem. As principais representantes desse grupo são *Bacillus cereus* II, Ccra, IMI-1, L1 e L2. O subgrupo 3b inclui as enzimas de *Aeromonas* spp. e são consideradas as verdadeiras carbapenemases, pois apresentam alta especificidade pela hidrólise de carbapenens. O terceiro subgrupo é o 3c e foi proposto para incluir somente a metalo- β -lactamase da *Legionella gormanii*. Esta enzima apresenta grande capacidade de hidrólise de cefalosporinas e apresenta propriedades bioquímicas diferentes das outras enzimas do grupo 3.

As metalo- β -lactamases da classe B cromossômicas são encontradas em *Stenotrophomonas maltophilia*, *Myroides (Flavobacterium) odoratum*, *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sóbria*, *Aeromonas salmonicida*, *Legionella gormanii* e *Bacillus cereus*. As enzimas produzidas por esses microrganismos variam na seqüência de aminoácidos e na atividade. Por exemplo, as enzimas encontradas em *Aeromonas* spp. apresentam atividade hidrolítica contra os carbapenens, enquanto que as outras enzimas têm amplo espectro poupando apenas o aztreonam (Livermore & Woodford, 2000).

As metalo- β -lactamases transferíveis pertencem a três famílias: IMP, VIM e SPM. Existem 11 variações de metalo- β -lactamases da família IMP e 4 tipos de metalo- β -

lactamases da família VIM. Essas enzimas têm sido isoladas de algumas enterobactérias, como *Serratia marcescens* e *Shigella flexneri*, e, principalmente, de Gram-negativos não fermentadores como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. A metalo- β -lactamase VIM-2 foi identificada numa cepa de *Enterobacter cloacae* na Coréia. A metalo- β -lactamase SPM-1 é uma enzima identificada recentemente em uma cepa de *P. aeruginosa* na cidade de São Paulo (Toleman *et al.*, 2002).

Alteração da permeabilidade de membrana

Dentre os vários mecanismos de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, a produção de β -lactamases é o mecanismo mais prevalente e importante. No entanto alterações de permeabilidade de membrana externa e efluxo ativo também são mecanismos descritos em *Enterobacter* spp.

Para muitos antibióticos, incluindo o grupo dos β -lactâmicos, o principal meio de transporte através da membrana externa das bactérias entéricas é um notável grupo de proteínas de et

rapidamente pela membrana de *E. coli* (Nikaido, 1994). A proposta para explicar a sensibilidade do *Enterobacter cloacae* ao imipenem, em presença de resistência às cefalosporinas de terceira geração, baseia-se na maior capacidade de acesso do imipenem às células alvo, mediada pelo trânsito rápido, provavelmente, por meio de diversos canais de porinas (Pechere, 1991).

As porinas podem aumentar ou diminuir as taxas de penetração dos antibióticos β -lactâmicos na célula bacteriana (Nitzan *et al.*, 2002). Cada microrganismo possui características próprias e, quanto à permeabilidade da membrana externa, sabe-se que a membrana de *P. aeruginosa* é 100 vezes menos permeável do que a membrana externa de *E. coli* (Parr *et al.*, 1987; Yamazaki *et al.*, 1989).

Porinas não específicas, como OmpF e OmpC de *E. coli*, formam homotrímeros na membrana externa. Esses trímeros de porinas são constituídos por grandes subunidades monoméricas que sofrem constrição no meio da membrana por uma alça interna, *loop 3* (L3) (Koebnik *et al.*, 2000). A resolução da estrutura tridimensional da OmpF e OmpC da *E. coli* e da OmpK36 da *Klebsiella pneumoniae* tem levado à identificação dos domínios funcionais dos canais das enterobactérias (Cowan *et al.*, 1992; Dutzler *et al.*, 1999; Bredin *et al.*, 2002).

Entre os vários mecanismos de resistência descritos em *Enterobacter* spp., a alteração de permeabilidade da membrana externa por uma deficiência de porina, associada à expressão da atividade de cefalosporinases, é freqüentemente detectado em isolados clínicos resistentes. Entre as enterobactérias, a prevalência daquele fenótipo (deficiência de porina) é especialmente alta em *E. aerogenes* (Charrel *et al.*, 1996; Malléa *et al.*, 1998). Atualmente existem duas porinas bem caracterizadas de *E. aerogenes* envolvidas na suscetibilidade aos β -lactâmicos: Omp35 e Omp36. As diferentes seqüências e propriedades do canal dessas porinas refletem na diferença biológica relacionada à sensibilidade aos β -lactâmicos. A estrutura da Omp35 está intimamente relacionada à família OmpF das enterobactérias, enquanto a Omp36 pertence ao grupo de porinas similares à OmpC. A caracterização funcional da Omp35 mostrou que as atividades do imipenem e cefepima, duas moléculas *zwitterions*, são apenas fracamente afetadas comparadas às drogas com moléculas grandes e carregadas negativamente (Bornet *et al.*, 2004; Thiolas *et al.*, 2004). Portanto a presença da porina Omp35 na bactéria está associada à sensibilidade aumentada às grandes cefalosporinas carregadas negativamente como a ceftriaxona. Observações

similares têm sido reportadas com a OmpK35 e OmpK36 de *Klebsiella pneumoniae* (Martinez-Martinez *et al.*, 1996; Doménech-Sanchez *et al.*, 2003).

Os carbapenens têm sido muito utilizados para tratar infecções causadas por *Enterobacter* spp. multi-resistentes, entretanto a resistência a esses agentes está começando a emergir (Ehrhardt *et al.*, 1993; De Gheldre *et al.*, 1997). O mecanismo de resistência aos carbapenens geralmente é uma combinação de carbapenemase específica e alteração na permeabilidade de membrana (porina) (Tzouvelekis *et al.*, 1992; Bornet *et al.*, 2000). Dados de Yigit e colaboradores (2002) sugerem que a resistência ao imipenem em *E. aerogenes* está associada primariamente à ausência da expressão de análogos das porinas OmpC (42-kDa) e OmpF (39-kDa), o que também resulta na redução da sensibilidade ao meropenem e à cefepima. A incidência dessa resistência tende a aumentar com o uso indiscriminado de carbapenens, e o resultado será uma constelação de mecanismos, incluindo carbapenemases, bomba de efluxo, deficiência de porinas e maior produção de AmpC, mais do que um simples mecanismo.

A resistência ao carbapenem devido a alterações nos lipopolissacarídeos também foi reportada em *E. aerogenes* (Leying *et al.*, 1991).

1.5 – Resistência a outros antimicrobianos e multirresistência

Além dos β -lactâmicos, outras classes de antimicrobianos como quinolonas e aminoglicosídeos apresentam boa atividade contra Gram-negativos, sendo, muitas vezes, opções terapêuticas eficazes para o tratamento de infecções causadas por *Enterobacter* spp.. Esses antimicrobianos podem ser usados como monoterapia ou associados aos β -lactâmicos. No entanto, semelhantemente a essa última droga, o aumento do consumo de quinolonas e aminoglicosídeos nas últimas décadas tem levado ao surgimento de cepas resistentes a esses antibióticos. O programa MYSTIC

antimicrobianos são bactérias resistentes a múltiplas drogas, sendo identificados com mais frequência em pacientes internados em UTIs (Vatopoulos *et al.*, 1999).

A resistência a múltiplas drogas (MDR – *multidrug resistance phenotype*) está relacionada a todas as espécies bacterianas, mas tem sido mais estudada em *Enterobacteriaceae*, particularmente em *E. coli*.

O fenótipo MDR geralmente associa uma diminuição na síntese de porinas com um aumento na atividade de bombas de efluxo para restringir a concentração intracelular de vários antibióticos, incluindo β -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, aminoglicosídeos e quinolonas. A resistência resulta da ativação de genes cromossômicos por indução ou mutação e por transferência de DNA (Livermore, 2003). O tratamento com uma simples droga pode levar a resistência cruzada a outros antimicrobianos (George, 1996).

Em isolados clínicos que exibem alta resistência aos antibióticos de amplo espectro, MDR é o resultado de hidrólises enzimáticas, mutações no sítio de ação da droga e modificações na permeabilidade do antibiótico, incluindo alteração de porina e indução de bombas de efluxo (Charrel *et al.*, 1996; Malléa *et al.*, 1998; Linde *et al.*, 2002). Nesses casos, a existência de cepas clínicas resistentes a vários antibióticos estruturalmente não relacionados contribui para a falência da terapia antimicrobiana dos pacientes, disseminação de surtos bacterianos e mudanças na flora do paciente devido à vantagem seletiva do microrganismo.

Em *E. aerogenes*, assim como em outras enterobactérias, tem sido descrito que alguns componentes da regulação da cascata do sistema MDR, por um lado, regulam negativamente (*downregulation*) a expressão de porinas não específicas da membrana externa como a OmpF e por outro lado, induzem à superprodução da bomba de efluxo AcrAB-TolC (Alekshun & Levy, 1997; Barbosa & Levy, 2000; Chollet *et al.*, 2004), a qual está associada à resistência às quinolonas em *E. coli* e *Enterobacter cloacae* (Maneewannakul & Levy, 1996; Linde *et al.*, 2002). Essa duplicidade de mecanismos na ativação do MDR pode explicar a resposta rápida e a eficiência adaptativa do *E. aerogenes* durante o tratamento antimicrobiano e a emergência de cepas MDR *in vivo* (Bornet *et al.*, 2003; Gayet *et al.*, 2003).

1.6 – Tipagem Molecular

Nos últimos anos, a avaliação genotípica das amostras através de técnicas moleculares tem sido utilizada por médicos, microbiologistas e epidemiologistas como uma importante ferramenta para investigação de diversos problemas envolvendo doenças infecciosas (Pfaller, 1999). A necessidade de avaliar a relação ou semelhança entre microorganismos de uma mesma espécie pode surgir durante a investigação de um surto quando se quer determinar o modo de disseminação naquele microambiente (unidade hospitalar, por exemplo) e/ou a fonte ou origem do patógeno, uma vez que as características fenotípicas não são suficientes para caracterizar uma determinada cepa ou clone (Sader *et al.*, 1995; Pfaller *et al.*, 2000). Os resultados obtidos pela aplicação dessa técnica são fundamentais ainda na orientação das medidas de controle de infecção hospitalar a serem implantadas.

Entre as técnicas de tipagem molecular amplamente utilizadas em *Enterobacter* spp. está a eletroforese em campo elétrico variado (*pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE) e a ribotipagem. A ribotipagem é um método de tipagem de aplicabilidade universal e que, com a automação, tornou-se um método com reprodutibilidade notável e de fácil interpretação; é uma técnica, porém, que ainda necessita de padronizações gerais para uma melhor interpretação dos resultados.

A ribotipagem caracteriza as cepas por meio da localização cromossomal e do número de cópias do gene do RNA ribossômico (rRNA). O DNA clivado é hibridizado com sondas nucleicas específicas complementares ao DNA que codifica o RNA ribossomal de *E. coli*, marcadas isotópica ou biologicamente. O espectro de aplicabilidade dessa sonda é amplo, uma vez que seqüências de rRNA são altamente conservadas no processo evolutivo dos procariotos. (Hollis *et al.*, 1999).

1.7 – Perfil do consumo de antimicrobianos no Hospital São Paulo

O Hospital São Paulo (HSP) é um hospital geral que presta assistência médica à população local e de outros municípios do estado. Possui cerca de 644 leitos, distribuídos em 33 enfermarias de diversas especialidades, sendo 33 leitos em UTIs. Conta com serviços de transplante de rins, coração, pulmão, fígado, pâncreas e medula óssea. Inclui todas as especialidades médicas e pronto socorro. Tem caráter público e a quase totalidade dos pacientes internados é proveniente do Sistema Único

de Saúde. Por se tratar de um hospital universitário, são encaminhados os casos mais complexos, que necessitam de maior tempo de internação e um número elevado de procedimentos invasivos e, por consequência, maior consumo e tempo de tratamento com antimicrobianos. Portanto não é de se admirar que esse tipo de instituição concentre altas taxas de microrganismos multirresistentes.

O Serviço de Racionalização do uso de antimicrobianos do Hospital São Paulo – UNIFESP, foi criado em janeiro de 1989 e utiliza como medida de controle uma ficha para justificativa por escrito quando um dos médicos do hospital deseja prescrever para seu paciente algum antimicrobiano de uso controlado. A pedra angular desse programa é a educação médica continuada que é realizada através da discussão diária dos casos com os médicos dos pacientes. Dessa forma, o hospital conta com uma equipe exclusiva que visa orientar e controlar a prescrição de alguns antimicrobianos.

O número de antibióticos utilizados no HSP é muito elevado, aproximadamente 40 drogas estão disponíveis no formulário terapêutico para uso enteral ou parenteral. Em um estudo realizado nessa instituição, analisou-se o perfil de consumo de 14 antimicrobianos (antimicrobianos que apresentaram maior consumo ou que eram controlados pelo Serviço de Racionalização do uso de antimicrobianos do hospital) em todo hospital, exceto as unidades pediátricas devido à impossibilidade de se obter valores de DDD nesta população. De acordo com esse estudo, os antimicrobianos mais consumidos entre 1996 a 2001 foram as cefalosporinas, e as enfermarias que mais consumiram antimicrobianos em DDD por 100 pacientes-dia foram as UTIs, Retaguardas I e II, e Unidade de Transplante de Medula Óssea/ Hematologia. Ainda nesse estudo, observou-se que as despesas globais com esses antimicrobianos entre 1996 e 2002 diminuíram em aproximadamente 18% ($p \leq 0,012$), caindo progressivamente de R\$ 6.527.912,87 em 1996, para R\$ 5.354.114,06 em 2001, apesar da média de pacientes-dia ter se elevado (Hidalgo, 2003).

No ano 2001, o HSP apresentou uma média de 160.668 pacientes-dia/ ano. O consumo em Dose Diária Definida (DDD) média anual dos antimicrobianos foi 53,7, sendo que a DDD média das cefalosporinas foi de 16,7. Entre os antimicrobianos dessa classe, a ceftriaxona foi o mais consumido em gramas e DDD durante o período de 1996 a 2001 (Figura 1). Quanto à ceftazidima, apresentou até 1999 um elevado consumo em todo hospital, mas após esse período, mostrou uma queda acentuada no consumo em gramas e DDD. Essa queda foi estatisticamente significativa e coincidiu

com o aumento do consumo das cefalosporinas de quarta geração. O cefepima foi introduzido no HSP em 1998 e, desde então evidenciou-se um aumento crescente e significativo no consumo deste antimicrobiano no hospital ($p \leq 0,012$) (Hidalgo, 2003). A utilização do cefepima pode ter sido importante para tentar estabilizar o consumo dos glicopeptídeos e reduzir o consumo dos carbapenens, segundo as normas preconizadas pelo *Center for Disease Control and Prevention* para preservar a atuação dessas drogas (CDC, 1994).

Além da cefalosporina de quarta geração, Hidalgo (2003) mostrou um aumento do consumo de outros antimicrobianos durante o período analisado. Entre eles está a vancomicina, ciprofloxacina, imipenem/ cilastatina e as polimixinas B e E. A ciprofloxacina foi a única quinolona analisada e apresentou aumento constante e significativo de consumo ($p \leq 0,03$), representando o terceiro antibiótico mais consumido no HSP durante os anos de 1996 a 2001. No consumo do imipenem, houve uma tendência de aumento, porém não estatisticamente significativa. Certamente a introdução das cefalosporinas de 4^a geração pode ter contribuído para diminuir a utilização desta droga. O elevado consumo de vancomicina pode estar associado à alta prevalência de estafilococos oxacilina resistentes no HSP, documentado no estudo de Farias e colaboradores (1997). Outros antimicrobianos em que se elevou o consumo nos últimos 4 anos, justificado pelo surgimento crescente de bactérias multirresistentes (principalmente *P. Aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.) no ambiente hospitalar, são as polimixinas B e E (Hidalgo, 2003).

Os aminoglicosídeos disponíveis no HSP são a amicacina e a gentamicina. Houve um predomínio na utilização da amicacina, a qual esteve entre os antimicrobianos de maior uso até 1998, mas que, a partir de 1999, apresentou uma diminuição significativa do consumo em todo hospital ($p \leq 0,017$). Esse fato também coincide com a introdução da cefepima, a qual apresenta boa atividade contra bactérias Gram-negativas e menos efeitos colaterais (Hidalgo, 2003).

Combater o uso indiscriminado de antimicrobianos e incentivar a administração correta, por tempo adequado, têm sido um desafio permanente. Medidas para diminuir a resistência bacteriana são fundamentais para qualquer instituição. Monitorizar o consumo dos antimicrobianos é, sem dúvida, um dos fatores primordiais para controlar o surgimento de resistência.

Diante do que foi exposto e da recente emergência de infecções causadas por cepas de *Enterobacter* spp. multirresistentes, é importante que sejam realizados estudos tanto do perfil de sensibilidade e dos mecanismos de resistência, quanto da adequação antimicrobiana para o tratamento das infecções causadas por esse patógeno.

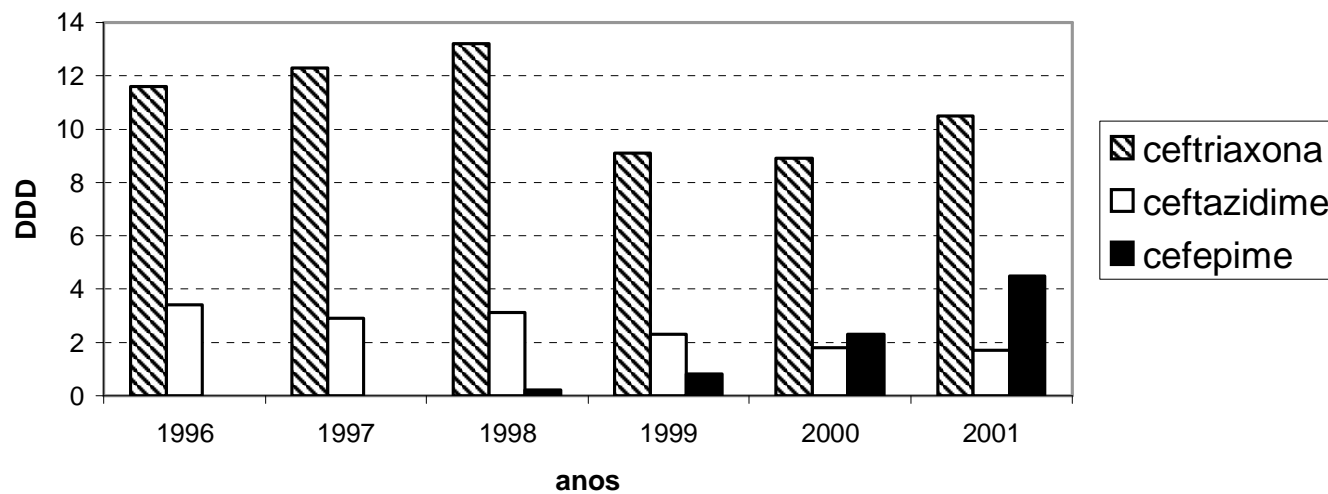


Figura 1 – Consumo das cefalosporinas em DDD médio no período de 1996 a 2001 (Hidalgo, 2003).

2 – OBJETIVOS

1. Avaliar a frequência de amostras resistentes à cefalosporina de quarta geração entre isolados de corrente sanguínea de *Enterobacter* spp. do Hospital São Paulo e do Instituto de Oncologia Pediátrica, UNIFESP no período de janeiro/ 2003 a março/ 2004;
2. Avaliar os prováveis mecanismos envolvidos na resistência à cefalosporina de quarta geração em amostras de *Enterobacter* spp.;
3. Avaliar a disseminação desse patógeno através da análise da similaridade genética entre as amostras de hemocultura isoladas no Hospital São Paulo e no Instituto de Oncologia Pediátrica, UNIFESP no período de janeiro/ 2003 a março/ 2004;
4. Avaliar a adequação da terapia antimicrobiana no tratamento das infecções de corrente sanguínea causadas por *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima.

3 – MÉTODOS

3.1 – Amostras bacterianas

Foram selecionadas para o estudo 93 amostras de *Enterobacter* spp., isoladas de hemoculturas, entre janeiro de 2003 e março de 2004, provenientes de pacientes internados no complexo do Hospital São Paulo – Universidade de São Paulo (HSP)/ Escola Paulista de Medicina e do Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP/ GRAAC). À medida que estas amostras eram isoladas e devidamente identificadas no Laboratório Central do Hospital São Paulo, eram enviadas ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) e consecutivamente armazenadas no banco de microrganismos, em solução de glicerol estéril e temperatura ambiente. Somente a primeira amostra isolada de cada paciente foi incluída no estudo.

3.2 – Identificação bacteriana

A identificação do gênero dos microrganismos foi realizada rotineiramente no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do HSP. A confirmação do gênero e a identificação das espécies foram processadas no sistema Vitek (AMS) (bioMeriux Vitek Inc., Hazelwood, MO).

3.3 – Avaliação da Sensibilidade *in vitro* aos Antimicrobianos

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados após isolamento e subcultivo das amostras em ágar sangue por duas vezes, conforme recomendado pelo *National Committee for Clinical Standards* – NCCLS (NCCLS, 2004). Definiu-se a concentração inibitória mínima (MIC) como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. As MIC50 e MIC90 foram definidas como as menores concentrações de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras, respectivamente. As amostras foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes, empregando os limites de sensibilidade preconizados pelo NCCLS (NCCLS, 2004).

Para o controle de qualidade dos testes de sensibilidade, utilizaram-se as seguintes amostras da *American Type Culture Collection* (ATTC): *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

3.3.1 – Preparo do inóculo bacteriano

Após o crescimento em placas de ágar sangue por 18 a 24 horas, com o auxílio de uma alça de sementeira, 3 a 5 colônias isoladas de *Enterobacter* spp. foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo Muller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). A suspensão bacteriana foi homogeneizada e a turvação medida em turbidímetro digital (Baxter[®], Sacramento, EUA). Para obtenção de uma concentração bacteriana em torno de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL correspondente a 0,5 da escala de McFarland (NCCLS, 2004).

3.3.2 – Etest[®]

O Etest[®] é baseado na combinação dos conceitos das técnicas de diluição e difusão. Como outros métodos para detecção da MIC, o Etest[®] quantifica diretamente a sensibilidade antimicrobiana através dos valores da MIC. Os valores das MICs por Etest[®] podem ser mais precisos que aqueles dos métodos convencionais baseados em diluições seriais descontínuas, pois as MICs por Etest[®] são obtidas a partir de um gradiente de concentração predefinida e contínua do antimicrobiano. Apesar do procedimento ser similar ao do teste de disco-difusão quanto à simplicidade e flexibilidade, como por exemplo, o inóculo, o meio de cultura e as condições de incubação, o Etest[®] não é um método de difusão e difere totalmente do conceito das metodologias convencionais de disco-difusão. O gradiente de concentração do antibiótico é pré-formado, predefinido, estável e não é dependente de difusão.

Quando uma fita de Etest[®] é aplicada numa superfície de um ágar semeado, há uma transferência direta e efetiva do gradiente antimicrobiano da fita para dentro da matriz do ágar. Um gradiente exponencial, contínuo e estável do antibiótico é formado diretamente abaixo da fita. Após incubação, quando o crescimento bacteriano torna-se visível, uma elipse central de inibição simétrica é visualizada. O valor da MIC é lido em µg/mL na intersecção da borda da elipse com a fita. Devido a grande estabilidade e

precisão do gradiente pré-definido, os valores da MIC por Etest® são reprodutíveis e equivalentes àqueles procedimentos de diluição preconizados pelo NCCLS.

Foram selecionados para realização da MIC das amostras de *Enterobacter* spp. incluídas neste estudo apenas os antimicrobianos de maior relevância clínica, utilizados no tratamento de infecções causadas por este patógeno. Os antimicrobianos testados foram: ceftazidima, cefotaxima, cefepima, piperacilina/tazobactam, imipenem, amicacina e gatifloxacina. A técnica do Etest® foi realizada seguindo rigorosamente as instruções do fabricante (AB Biodisk, Solna, Suécia).

As suspensões bacterianas com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland foram uniformemente semeadas em uma placa de Mueller-Hinton ágar (Oxoid, Inglaterra) e após um intervalo de 15 minutos, as fitas de Etest® contendo os antimicrobianos foram dispensadas na superfície do ágar.

As placas foram incubadas por 16 a 20 horas, à temperatura de 35°C. Conforme instruções do fabricante, a MIC de cada antimicrobiano foi determinada como sendo a primeira concentração acima da intersecção entre a fita de Etest® e a zona elíptica de inibição do crescimento bacteriano. As amostras foram classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes e, as MIC50s, MIC90s e o percentual de sensibilidade dos isolados de *Enterobacter* spp. foram calculados de acordo com os limites de sensibilidade estabelecidos pelo NCCLS para métodos quantitativos (NCCLS, 2004).

3.4 – Detecção das amostras de *Enterobacter* spp. produtoras de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL)

3.4.1 – Etest® ESBL screen

O teste fenotípico para a detecção de cepas de *Enterobacter* spp. produtoras de ESBLs foi realizado utilizando-se de fitas de Etest® disponíveis comercialmente para a detecção de ESBL em bactérias com β -lactamases cromossomal induzível. Nestas fitas, uma das extremidades é impregnada com gradiente de concentrações estáveis de cefepima (0,5 μ g/mL a 32 μ g/mL) e, a extremidade oposta da mesma fita apresenta concentrações de cefepima (0,125 μ g/mL a 8 μ g/mL) associadas a uma concentração fixa de ácido clavulânico (2 μ g/mL).

Uma suspensão bacteriana ajustada a 0,5 da escala de McFarland foi uniformemente semeada na placa de ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) e após 15 minutos, as fitas de Etest[®] foram dispensadas sobre a placa. As placas foram incubadas a 35°C, em aerobiose, por um período de 18 a 20 horas. Foram considerados isolados produtores de ESBL: amostras cuja razão da MIC de cefepima (PM) com a MIC de cefepima+ácido clavulânico (PML) foi ≥ 8 (redução $\geq 3,0$ diluições logarítmicas na presença de ácido clavulânico em comparação com a MIC de cefepima isoladamente); isolados que apresentaram uma zona “fantasma” de inibição abaixo do gradiente de concentração de cefepima ou apresentaram uma deformação na elipse de cefepima (Figura 2). Todos os testes utilizando fitas de Etest[®] foram realizados rigorosamente de acordo com as instruções do fabricante. Como cepas controles utilizou-se *E.coli* ATCC 35218 e *K. pneumoniae* ATCC 700603.

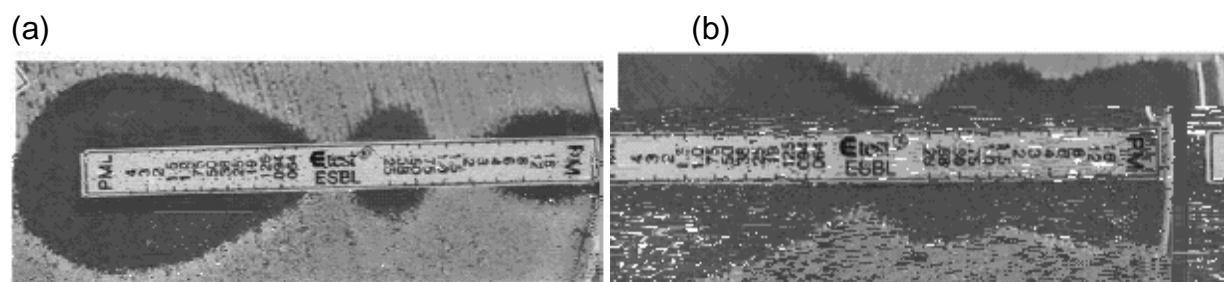


Figura 2 – (a) zona “fantasma” de inibição abaixo do gradiente de concentração de cefepima é indicativo de ESBL. (b) deformação na elipse de inibição de cefepima também é indicativo de ESBL (adaptado do artigo de Stürenburg *et al.*, 2004).

3.5 – Análise da similaridade genética das amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima

3.5.1 – Ribotipagem automatizada

Das 93 amostras avaliadas, 14 apresentaram sensibilidade reduzida a cefepima e, então, foram selecionadas para caracterização molecular através da técnica de ribotipagem automatizada. Uma amostra de *Enterobacter cloacae* sensível a cefepima foi também selecionada para tipagem.

A ribotipagem automatizada foi realizada pelo sistema RiboPrinter[®] *Microbial Characterization System* (Qualicon, Wilmington, EUA). Este processo automatizado inclui lise da célula bacteriana, clivagem do DNA bacteriano através de enzimas de

restrição, separação dos fragmentos de DNA em gel de agarose por eletroforese e, *southern blotting*.

Preparo das amostras

As amostras foram semeadas em ágar sangue e incubadas a 35°C por 24 horas, em aerobiose. O crescimento bacteriano obtido foi agrupado na placa com o auxílio de uma alça de loop estéril e descartável e transferido para a solução tampão (Sample Buffer - Qualicon, Wilmington, DE, USA) com um bastão plástico, também descartável, fornecido pelo fabricante. Esta suspensão composta pelas células bacterianas e 40 µL de tampão foi homogeneizada com auxílio de um agitador.

Foram transferidos 30 µL da suspensão bacteriana para um tubo cônico, apropriado para introduzir as amostras no aparelho.

Tratamento térmico

O tratamento térmico das amostras foi realizado previamente às etapas automatizadas inativando nucleases presentes e preparando as células para a lise. Ciclos de aquecimento e resfriamento foram realizados segundo o programa da unidade de tratamento térmico (*Heat Treatment Station*), equipamento que acompanha o aparelho de ribotipagem.

Após o tratamento térmico, 5 µL dos Reagentes de Lise A e B (Qualicon, Wilmington, DE, USA) foram adicionados à cada amostra para iniciar a ruptura da membrana das células. Em seguida, as amostras foram inseridas no aparelho e processadas.

Após o tratamento térmico o aparelho Riboprinter® realizou as seguintes etapas automatizadas: (1) Preparo do DNA, onde é realizada a extração do DNA das células bacterianas e a fragmentação do mesmo com a enzima de restrição *Eco RI*; (2) Separação e Transferência, caracterizada por uma corrida em gel de eletroforese, que separa os fragmentos por gradiente de peso molecular e pela transferência destes fragmentos que são imobilizados em uma membrana pela técnica de *Southern blotting* modificado; (3) Processamento da membrana: os fragmentos são expostos a um tratamento químico-enzimático com a sonda DNA ribossomal de *E. coli* e a um marcador quimioluminescente que revela fragmentos hibridizados; (4) Detecção: a imagem da membrana é capturada por uma máquina fotográfica, digitalizada e transferida eletronicamente para o computador acoplado ao aparelho. No computador a

imagem é tratada e comparada com o banco de dados para caracterização das cepas. Cinco marcadores de peso molecular são distribuídos no gel, o que permite que cada coluna, representando os dados da amostra, seja normalizada de acordo com um marcador padrão, baseado na intensidade das bandas (Hollis *et al*, 1999).

Coeficientes de similaridade são calculados pelo sistema de computação acoplado ao aparelho, baseando-se na posição e na intensidade das bandas. Todos os isolados que apresentam coeficientes de similaridade iguais ou maiores que 0,90 (90%), são caracterizados com o mesmo ribotipo. Amostras que apresentam coeficientes de similaridade $\leq 0,89$, são consideradas diferentes, ou com padrões de ribotipagem distintos (Hollis *et al*, 1999).

3.6 – Definições

Foram utilizadas as seguintes definições para o estudo:

Bacteremia verdadeira – foram consideradas bacteremias verdadeiras aquelas em que houve isolamento de bactérias em hemoculturas associado a quadro clínico compatível. Os parâmetros clínicos relevantes incluíam: história clínica e evolução sugestiva, exame clínico sugestivo de quadro infeccioso (Weinstein *et al.*, 1983; Bates *et al.*, 1991).

Bacteremia Primária – hemocultura positiva em uma ou mais amostras para microrganismo não relacionado como outro sítio infeccioso e apresentação de pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas: febre, hipotensão ou oligúria (CDC *Definitions of Nosocomial Infections*. St Louis: Mosby;1996).

Bacteremia Secundária - hemocultura positiva em uma ou mais amostras para microrganismo relacionado como outro sítio infeccioso e apresentação de pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas: febre, hipotensão ou oligúria (CDC *Definitions of Nosocomial Infections*. St Louis: Mosby;1996).

Falsa bacteremia ou contaminante – definida como a presença de hemocultura positiva na ausência de sinais ou sintomas de infecção (Pittet, 1993).

Bacteremia polimicrobiana – definida como o isolamento de mais de um microrganismo durante o mesmo episódio de bacteremia (Hermans, 1970).

A **antibioticoterapia prévia** foi definida como o uso de antimicrobiano sistêmico, por pelo menos 48 horas, até dez dias precedendo a ocorrência da infecção da corrente sanguínea (Seifert *et al.*, 1994).

A **gravidade da doença de base** foi definida segundo os critérios descritos por McCabe & Jackson (1962) com modificações, sendo os pacientes classificados em três grupos:

Grupo 1 – constituído por **doenças rapidamente fatais**. São enfermidades de aparecimento abrupto e de rápida evolução, cujo prognóstico estima-se em dias ou semanas. É o caso das leucemias agudas, das leucemias crônicas em crise blástica e neoplasias em estágio avançado.

Estão também incluídas neste grupo doenças crônicas com descompensação aguda que acarretam o aumento da letalidade de forma imediata, como por exemplo: miocardiopatias refratárias necessitando de terapia intensiva, síndrome de hipertensão portal com manifestações hemorrágicas graves, etc.

Grupo 2 – constituído por **doenças potencialmente fatais**, nas quais a expectativa de vida é maior. Podendo ser decorrente de alterações evolutivas anatômicas ou funcionais, previstas na história natural da doença. Exemplificando, estão a anemia aplásica, as leucemias crônicas, insuficiência renal em tratamento dialítico, insuficiência hepática, pancreatopatias crônicas, doença pulmonar com hipercapnia ou hipoxemia basais em níveis considerados não críticos, hepatopatia crônica com hipertensão portal sem manifestações hemorrágicas. Ou ainda, doenças que acarretam alterações na resposta imune, muitas vezes relacionadas à terapia instituída. Nesta categoria incluem-se os pacientes com transplante renal, cardíaco, pulmonar ou de medula óssea, as doenças do colágeno com terapia imunossupressora e as neoplasias em tratamento quimioterápico.

Grupo 3 – constituído por **doença de base não fatal ou ausência de doença de base**. Pacientes com doenças de base não fatais foram considerados como portadores de doenças com prognóstico e sobrevida superiores aos anteriormente citados, cuja terapia empregada não foi associada à imunossupressão. Neste grupo, incluem-se as neoplasias consideradas com cura clínica após tratamento cirúrgico, hipertensão arterial sistêmica de leve a moderada, diabetes mellitus compensado, úlcera péptica, hipo ou hipertireoidismo, doença pulmonar obstrutiva crônica compensada e miocardiopatia com insuficiência cardíaca compensada (classes I e II, segundo a New York Heart Association).

As bacteremias foram classificadas como **hospitalares**, se ocorreram 48 horas após a internação, ou se ocorreram até 48 horas da data de internação hospitalar para pacientes com hospitalização recente (menos de 2 semanas) e **comunitárias**, se

estavam presentes ou em incubação no momento da internação, não se associando a nenhum procedimento hospitalar.

A **fonte de bacteremia** foi considerada bacteriologicamente confirmada quando houve evidência de infecção local, com o crescimento do mesmo agente nas 48 horas de obtenção da hemocultura positiva. A fonte, com sinais de infecção, mas sem o isolamento local do mesmo agente, foi considerada como fonte clínica de bacteremia. Fontes não comprovadas bacteriológica ou clinicamente foram consideradas como indeterminadas.

As fontes foram designadas como: pulmonar, urinária, gastrointestinal, pele, ferida cirúrgica, sistema nervoso central e relacionadas a cateter endovenoso. A fonte foi considerada respiratória (pulmonar) baseada nos dados clínicos e radiológicos.

A **terapia antimicrobiana** foi considerada **adequada** se utilizado pelo menos um dos antimicrobianos ao qual a bactéria era sensível “in vitro” nas 48 horas após a coleta da hemocultura. A terapia foi designada **corrigida**, quando um dos antibióticos a que a bactéria era sensível “in vitro” foi introduzido somente após 48 horas da coleta da primeira hemocultura positiva. Se o microrganismo isolado não era sensível “in vitro” aos antimicrobianos utilizados, a terapia foi considerada **inadequada**.

4 – Resultados

Entre as 93 amostras clínicas de *Enterobacter* spp. avaliadas no Hospital São Paulo e no Instituto de Oncologia Pediátrica entre janeiro de 2003 e março de 2004, o *Enterobacter cloacae* foi a espécie mais freqüente (90,3% - 84 isolados), seguido do *Enterobacter aerogenes* (7,5% - 7 isolados). Apenas uma amostra foi identificada como *Enterobacter amnigenus* biogrupo 2 (subespécie do grupo *cloacae*) e outra como *Enterobacter hormaechei*. Todas as amostras foram provenientes de hemoculturas e somente uma por paciente foi incluída no estudo.

A distribuição dos 93 isolados de *Enterobacter* spp. no hospital está apresentada na Figura 3 e pode ser simplificada da seguinte forma: unidades pediátricas, incluindo pediatria clínica, neonatologia e infectopediatria (40,9%); unidades clínicas (22,6%); unidades cirúrgicas, incluindo ginecologia (14%); UTI adulto (geral) (9,7%); UTI pediátrica (6,5%); Instituto de Oncologia Pediátrica - IOP (4,3%) e outras unidades (2,1%).

Aproximadamente metade (47,3%) das amostras de infecção de corrente sanguínea por *Enterobacter* spp. no HSP entre os anos de 2003 e 2004 foram isoladas da pediatria (pediatria clínica, neonatologia, infectopediatria e UTI pediátrica).

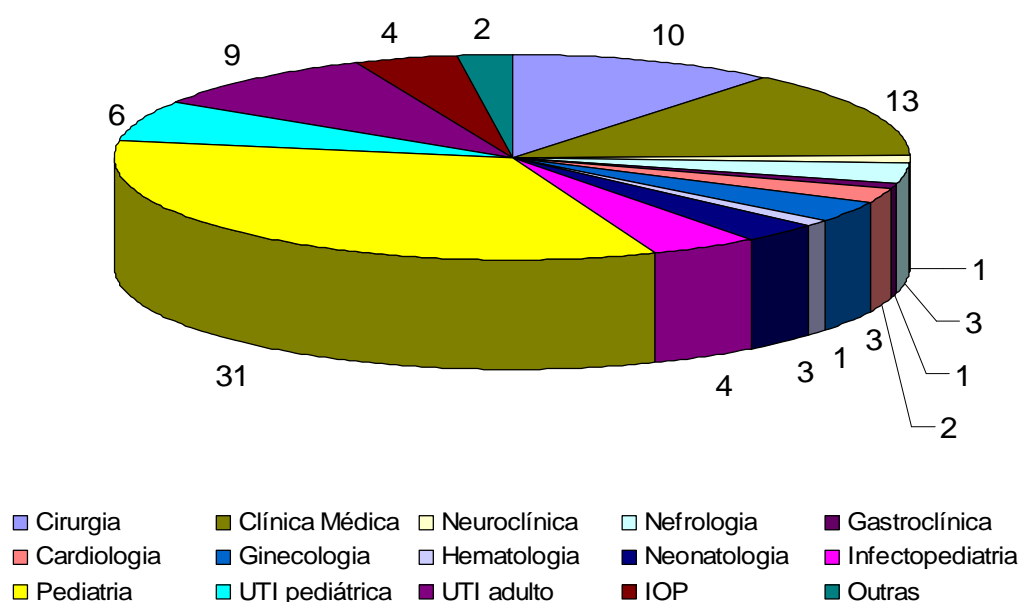


Figura 3 – Distribuição das 93 amostras de *Enterobacter* spp. de acordo com as diferentes unidades clínicas do Hospital São Paulo.

4.1 – Avaliação da sensibilidade aos agentes antimicrobianos

Na Tabela 6, estão apresentados os dados referentes à potência e ao espectro de atividade dos 7 agentes antimicrobianos testados pela técnica de Etest[®] contra as 93 amostras de *Enterobacter* spp. avaliadas.

Entre os isolados de *Enterobacter* spp. testados, o carbapenem, imipenem, foi o único capaz de inibir o crescimento de 100% das amostras. O segundo antimicrobiano mais ativo foi a amicacina (MIC₅₀, 3 µg/mL; 86,0% de sensibilidade), seguido da gatifloxacina (MIC₅₀, 0,03 µg/mL; 84,9% de sensibilidade), e da cefalosporina de quarta geração, cefepima (MIC₅₀, 0,09 µg/mL; 84,9% de sensibilidade).

Houve grande variação nas taxas de sensibilidade entre as cefalosporinas de terceira e quarta gerações. As cefalosporinas de terceira geração foram os agentes que apresentaram as menores taxas de sensibilidade. A cefotaxima foi a cefalosporina com menor atividade antimicrobiana (68,8% dos isolados apresentaram sensibilidade a este agente), seguido pela ceftazidima (72,2% dos isolados apresentaram sensibilidade). A cefalosporina de quarta geração, cefepima, foi 4 vezes mais potente que a ceftazidima, ou seja, as MICs para cefepima (MIC₅₀, 0,09 µg/mL) foram, em geral, 4 vezes menores que as MICs para ceftazidima (MIC₅₀, 0,38 µg/mL).

A quinolona, gatifloxacina, exibiu atividade antimicrobiana contra os isolados de *Enterobacter* spp. testados semelhante à cefalosporina de quarta geração (86,0% de sensibilidade). A associação de penicilina com inibidor de β-lactamase, piperacilina/tazobactam, também apresentou boa atividade contra esses isolados (MIC₅₀, 3 µg/mL; 81,7% de sensibilidade).

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana *in vitro* de diversos agentes contra os 93 *Enterobacter* spp. isolados de hemoculturas no Hospital São Paulo

Agente Antimicrob.	Distribuição das Concentrações Inibitórias (µg/mL) ^b														MIC _{50/90} ^a (µg/mL)	% Sens. ^b	% Res.
	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	≥128			
β-lactâmicos																	
Cefotaxima					47	8	2	4	3			12	3	14	0,25/ >256	68,8	18,3
Ceftazidima			3	2	35	19	4	1	2	1		4	5	17	0,38/ >256	72,0	28,0
Cefepima		2	34	22	11	3	3	3		1	2	3		9	0,09/ 32	84,9	12,9
Piperacilina/ tazobactam							1	22	50	1	2	2	1	14	3/ > 256	81,7	15,1
Imipenem					10	62	16	4	1						0,38/ 0,75	100	0
Quinolonas																	
Gatifloxacina		58	13	1	3	2	2		1	3	1	1	8		0,03/ 16	84,9	14,0
Aminoglicosídeos																	
Amicacina					1			35	39		5	4	3	6	3/ 32	86,0	9,7

a. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada por E-test.

b. *Breakpoints* para sensibilidade e resistência segundo os critérios do NCCLS [2004]: ceftazidima e cefepima - ≤ 8 µg/mL para isolados sensíveis (S), 16µg/mL para isolados intermediários (I) e ≥32µg/mL para isolados resistentes (R). Cefotaxima: ≤ 8 µg/mL – S, 16-32µg/mL – I, ≥64µg/mL – R. Piperacilina/ tazobactam: ≤16/4µg/mL – S, 32/4-64/4µg/mL – I, ≥128/4µg/mL – R. Imipenem: ≤ 4 µg/mL – S, 8µg/mL – I, ≥16µg/mL – R. Gatifloxacina: ≤ 2 µg/mL – S, 4µg/mL – I, ≥8µg/mL – R. Amicacina: ≤ 16µg/mL – S, 32µg/mL - I, ≥64µg/mL – R .

c. Os isolados resistentes estão em vermelho, aqueles com resistência intermediária estão em preto e os isolados sensíveis estão em negro.

4.2 – Avaliação das amostras de *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida as cefalosporinas de amplo espectro

A Tabela 7 evidencia a brusca redução da sensibilidade aos antimicrobianos nos isolados com sensibilidade reduzida tanto à cefalosporina de terceira geração quanto à cefalosporina de quarta geração, quando comparado aos isolados sensíveis a estes agentes. A porcentagem de sensibilidade aos antimicrobianos contra as amostras de *Enterobacter* spp. intermediárias e resistentes à ceftazidima foi muito baixa, sendo que o imipenem foi o único agente com boa atividade contra esses isolados. Todos os antibióticos testados *in vitro*, exceto imipenem, foram capazes de inibir apenas 50% ou menos dessas amostras.

Depois do carbapenem, a amicacina e a gatifloxacina foram os antimicrobianos mais ativos contra os isolados de *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida à ceftazidima (50% de sensibilidade), seguida da cefalosporina de quarta geração, cefepima (46,2% de sensibilidade) e da piperacilina/tazobactam (42,3% de sensibilidade). Entre os isolados com sensibilidade reduzida à cefepima, o aminoglicosídeo e a quinolona apresentaram porcentagens de sensibilidades ainda menores (28,6 e 21,4%, respectivamente).

Tabela 7– Comparação da sensibilidade antimicrobiana entre isolados de *Enterobacter* spp. sensíveis e com sensibilidade reduzida às cefalosporinas de amplo espectro.

Antimicrobiano classe/agente	Isolados sensíveis (67)	% Sensibilidade ^a	
		Isolados resistentes a ceftazidima (26)	Isolados resistentes ^b a cefepima (14)
β-lactâmicos			
Cefotaxima	94,0	3,8	0
Ceftazidima	100,0	0	0
Cefepima	100,0	46,2	0
Piperacilina/tazobactam	97,0	42,3	7,1
Imipenem	100,0	100,0	100,0
Aminoglicosídeos			
Amicacina	100,0	50,0	28,6
Fluoroquinolona			
Gatifloxacina	98,5	50,0	21,4

a - Interpretado pelos critérios do NCCLS 2004; b – I, intermediário e R, resistente.

b – Isolados resistentes e isolados com resistência intermediária.

Na análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Enterobacter* spp. entre as diferentes unidades hospitalares, observou-se um maior número de amostras resistentes aos agentes avaliados, especialmente cefalosporinas, nas UTIs, com apenas 33,3% e 53,3% de sensibilidade à ceftazidima e à cefepima, respectivamente (Figura 4). A diminuição da sensibilidade a essas drogas ocorreu também nas unidades cirúrgicas, seguido das unidades clínicas (adulto). No entanto, as amostras de *Enterobacter* spp. isoladas das unidades pediátricas mostraram alta sensibilidade aos agentes avaliados, com 92,9 % de isolados sensíveis à ceftazidima e 95,2% sensíveis à cefepima.

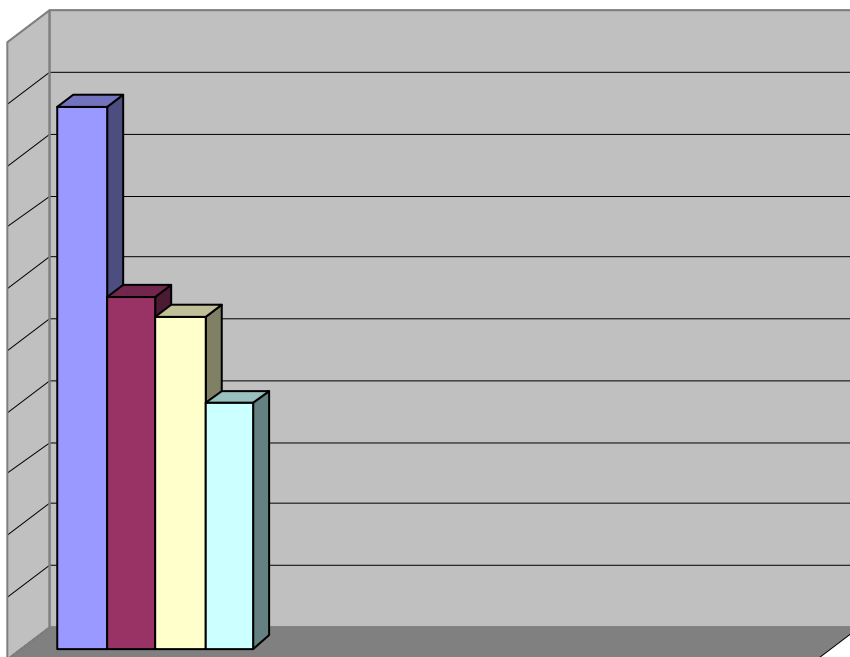


Figura 4– Distribuição em porcentagem das amostras de *Enterobacter* spp. sensíveis às cefalosporinas de amplo espectro de acordo com a unidade hospitalar.

A distribuição dos 93 pacientes com infecção por *Enterobacter* spp., de acordo com a idade e com a categoria de sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro, está apresentada na Tabela 8. Mais da metade dos pacientes encontram-se na faixa etária de 0 a 12 anos (infância). Entretanto, a porcentagem de isolados resistentes às cefalosporinas é maior nos pacientes com mais de 12 anos (51,2% de resistência à ceftazidima e 24,4% de resistência à cefepima), comparado aos pacientes de 0 a 12 anos (10% de resistência à ceftazidima e 4% de resistência à cefepima).

Não houve diferença importante entre os sexos, masculino e feminino, quanto a sensibilidade à ceftazidima (18,4% e 31,3% de resistência, respectivamente).

Tabela 8 – Frequência dos pacientes por idade e porcentagem da sensibilidade à ceftazidima e à cefepima de acordo com a faixa etária.

Faixa etária	Categoria de ceftazidima (%)		Categoria de cefepima (%)		Total (n)
	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	
0 – 1	88,5	11,5	96,2	3,8	26
2 – 12	91,7	8,3	95,8	4,2	24
13 – 60	48,0	52,0	68,0	28,0	25
> 60	50,0	50,0	75,0	18,7	16
Total	71,4	25,3	84,6	13,2	91

4.3 – Detecção fenotípica da produção de ESBL

De acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante do Etest[®] ESBL screen – cefepima/ cefepima+ácido clavulânico (AB Biodisk, Solna, Suécia), das 93 amostras de *Enterobacter* spp. avaliadas, apenas 5 (5,4%) foram consideradas produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs), as quais apresentaram teste fenotípico positivo como demonstrado na Figura 5. Entre as amostras resistentes as cefalosporinas de amplo espectro, a produção de ESBLs ocorreu em 19,2% das amostras resistentes à ceftazidima e 28,6% daquelas com sensibilidade reduzida à cefepima.

Entre os isolados produtores de ESBL pelo teste fenotípico, um deles, identificado como *Enterobacter amnigenus* biogrupo 2, apresentou sensibilidade *in vitro* à cefepima, com MIC de 2 μ g/mL para este antimicrobiano. As cefalosporinas de terceira geração apresentaram-se resistentes para todos os isolados produtores de ESBL, e a penicilina de amplo espectro, piperacilina, associada ao inibidor de beta-lactamase, tazobactam, foi capaz de inibir o crescimento de 2 desses isolados (Tabela 9).

Apenas uma amostra com fenótipo positivo para a produção de ESBL apresentou resistência à gatifloxacina (MIC 32 μ g/mL), sendo que uma das amostras sensível a este antimicrobiano (paciente 11), mostrou também sensibilidade ao aminoglicosídeo amicacina.

Entre os antimicrobianos avaliados, o imipenem foi o único capaz de inibir o crescimento de 100% dos isolados produtores de ESBL.

Observa-se que, entre as amostras intermediárias e resistentes à cefepima com fenótipo negativo para a produção de ESBL as concentrações inibitórias mínimas para este antimicrobiano mostraram-se, em geral, mais elevadas comparadas às MIC daquelas com fenótipo positivo para ESBL. O mesmo se aplica à cefalosporina de terceira geração, ceftazidima (Tabela 9).

A gatifloxacina e a piperacilina/tazobactam foram, depois do carbapenem, os antimicrobianos mais potentes contra as amostras de *Enterobacter* spp. produtoras de ESBL. Em relação as 16 amostras avaliadas na tabela 9, é importante ressaltar que os únicos isolados que apresentaram sensibilidade para essas drogas são, também, produtores de ESBL (amostra dos pacientes 10, 11, 12 e 16 – sensíveis à gatifloxacina; amostras 12 e 16 – sensíveis à piperacilina/tazobactam).

Tabela 9 – Perfil de sensibilidade e resultado do teste fenotípico para ESBL dos isolados de *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida a cefepima.

N. Pcte	Especie	Imp	Cefotax	Amica	Pipetazo	Gati	Ceftaz	Cefepima	Fenótipo
1	<i>E. cloacae</i>	0,5	>256	24	>256	8	64	>256	-
2	<i>E. cloacae</i>	0,38	>256	>256	>256	>32	>256	>256	-
3	<i>E. cloacae</i>	0,38	>256	12	>256	>32	>256	>256	-
4	<i>E. cloacae</i>	1	32	24	>256	32	>256	>256	-
5	<i>E. cloacae</i>	2	32	32	>256	>32	>256	>256	-
6	<i>E. cloacae</i>	0,75	>256	96	>256	>32	>256	256	-
7	<i>E. cloacae</i>	1,5	>256	6	>256	>32	>256	256	-
8	<i>E. cloacae</i>	0,5	>256	16	64	6	64	192	-
9	<i>E. cloacae</i>	0,38	>256	>256	256	>32	48	192	+
10	<i>E. aerogenes</i>	1	>256	48	32	0,25	32	32	+
11	<i>E. cloacae</i>	0,38	>256	2	>256	0,02	>256	32	+
12	<i>E. cloacae</i>	0,38	>256	256	4	1	256	24	+
13	<i>E. cloacae</i>	1,5	>256	96	>256	>32	>256	16	-
14	<i>E. cloacae</i>	0,75	>256	48	>256	>32	>256	16	-
15	<i>E. cloacae</i>	0,38	>256	48	>256	16	>256	8	-
16	<i>E. amnigenus</i>	0,38	32	192	4	1	>256	2	+

* As concentrações dentro dos quadros amarelos representam isolados sensíveis aos antimicrobianos correspondentes.

Abreviaturas: Imp, imipenem; Cefotax, cefotaxima; Amica, amicacina; Gati, gatifloxacina; Ceftaz, ceftazidima.

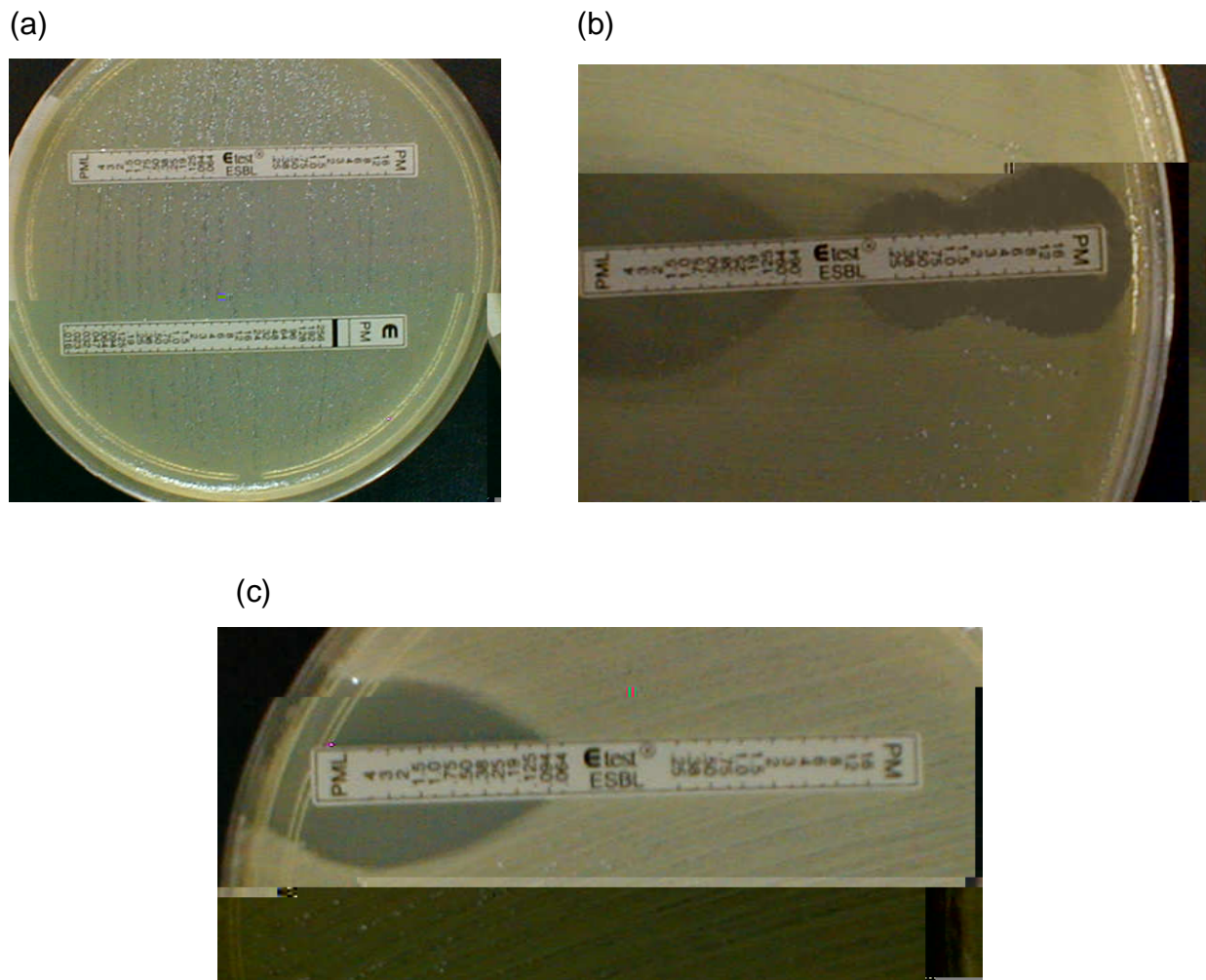


Figura 5 – Amostras de *Enterobacter cloacae* resistente à cefepima com fenótipo negativo (a) e, com fenótipo positivo para a produção de ESBL. (b e c). PM – cefepima, PML – cefepima + ácido clavulânico.

4.4 – Análise da similaridade genética entre os isolados de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima

A análise dos padrões gerados pela ribotipagem das 14 amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima permitiu a identificação de 7 ribogrupos distintos, indicando uma diversidade clonal. Além dessas 14 amostras com resistência à cefepima, uma amostra sensível a este antimicrobiano isolada no mesmo período de tempo que as amostras resistentes, foi incluída como controle na ribotipagem. Os perfis foram divididos em ribotipos ou ribogrupos designados pelo número da corrida, seguido pelo número correspondente da linha em que a amostra foi identificada pela primeira vez.

Dentre os 7 ribogrupos, 3 foram detectados em mais de uma amostra (paciente). O ribogrupo 150-1 foi detectado em 6 amostras, isoladas em 4 unidades diferentes do

Hospital São Paulo. Uma amostra pertencente a este clone apresentou fenótipo positivo para ESBL (Tabela 10). O ribogruppo 150-2 foi detectado em 2 amostras clínicas pertencentes à mesma unidade hospitalar (UTI geral). Os demais ribogruppos foram isolados em diferentes unidades do HSP. As 4 amostras positivas para a produção de ESBL pertencem a ribogruppos distintos, e dentre elas, 3 foram isoladas na Clínica médica do Hospital São Paulo e uma delas foi isolada no Instituto de Oncologia Pediátrica, como pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10 – Similaridade genética das amostras de *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida à cefepima.

Nº Paciente	Ribogruppo	Data Coleta	Unidade Hospitalar	Cefepima MIC (µg/mL)	Teste Fenotípico ESBL
2	150-1	30-JAN-2003	Gastrocirurgia	> 256	-
10	153-7	22-FEV-2003	IOP	32	+
8	150-2	28-FEV-2003	UTI geral	192	-
1	150-2	02-MAR-2003	UTI geral	> 256	-
12	150-4	13-MAR-2003	UTI geral	24	+
14	150-1	01-ABR-2003	Enf. 11º andar	16	-
9	150-1	12-JUN-2003	UTI geral	192	+
13	150-7	17-JUN-2003	Enf. 11º andar	16	-
6	150-8	23-JUN-2003	Cirurgia cardiac.	256	-
7	150-8	02-SET-2003	UTI geral	256	-
11	153-2	15-JAN-2004	Pediatria	32	+
3	150-1	13-FEV-2004	UTI geral	> 256	-
4	150-1	13-FEV-2004	UTI geral	> 256	-
5	150-1	16-MAR-2004	Neurocirurgia	> 256	-

Label/	Comment/	Presumptive ID/	RiboGroup/	Sim to Sel	RiboPrint(R) Pattern
A10480	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-1 1.00	
A11235	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-1 0.93	
A20096	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-1 0.92	
A13550	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-1 0.88	
A13501	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-1 0.85	
A14008	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-1 0.87	
A10833	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-2 0.54	
A10831	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-2 0.49	
A10922	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-4 0.69	
A11297	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-7 0.73	
A11334	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-8 0.83	
A12035	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-150-S-8 0.81	
A13125	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-153-S-2 0.66	
A13570	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	cloacae	RIB01 222-153-S-6 0.48	
A10740	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	aerogenes	RIB01 222-153-S-7 0.18	
A10739	Hospital Sao Paulo	Enterobacter	aerogenes	RIB01 222-153-S-7 0.20	

Figura 6 – Foto da Ribotipagem Automatizada caracterizando a similaridade genética entre os isolados de *Enterobacter* spp.

4.5 – Análise da adequação da terapia antimicrobiana entre os isolados de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima

Na Tabela 11, encontram-se alguns dados clínicos e demográficos relacionados aos pacientes internados no HSP no ano de 2003 e início de 2004, que adquiriram infecções de corrente sanguínea por *Enterobacter* spp. resistente à cefepima e/ou com fenótipo positivo para a produção de ESBL.

A maioria das bacteremias resistentes à cefepima foi adquirida no hospital e a maior parte dos pacientes eram do sexo masculino com mais de 40 anos de idade. As unidades mais freqüentemente relacionadas à internação dos pacientes portadores desta infecção foram as unidades de terapia intensiva e as unidades cirúrgicas.

Os pacientes, em geral, possuíam doenças de base graves potencialmente fatais (de acordo com os critérios de classificação de McCabe & Jackson, 1962) e, aproximadamente metade deles desenvolveram bacteremia a partir de um foco infeccioso distante no organismo. A fonte de todas estas bacteremias secundárias foi pulmonar (exceto paciente 2, que não foi possível determinar). A maioria desses

pacientes foi exposta a antibióticoterapia prévia com cefalosporina de terceira geração, carbapenem, quinolona, ou com a própria cefepima. Aproximadamente 50% dos pacientes com hemoculturas positivas para *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima foram a óbito.

Entre as espécies de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima, apenas um dos 14 isolados pertencia a espécie *Enterobacter aerogenes* (paciente 10), os demais eram *Enterobacter cloacae*. Apesar dos isolados 15 e 16 apresentarem sensibilidade à cefepima (MIC 8µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente), o isolado 16 (*Enterobacter amnigenus* biogrupo 2) foi positivo no teste fenotípico para a produção de ESBL. Outros 4 isolados expostos na tabela 5 também são produtores de ESBL (isolados 9, 10, 11 e 12).

Três dos cinco pacientes com fenótipo positivo para ESBL utilizaram cefalosporinas de amplo espectro até 10 dias anteriores à coleta da hemocultura (9, 10 e 16). A maioria dos pacientes com *Enterobacter* spp. produtor de ESBL apresentavam doenças de base potencialmente ou rapidamente fatais (segundo os critérios de classificação de McCabe & Jackson, 1962) e adquiriram a infecção durante a hospitalização. Apenas um desses pacientes (16) foi a óbito (relacionado à infecção).

Na tabela 11 pode-se, também, observar, a antibióticoterapia empregada no momento da coleta (ATB coleta – 48hs) e após o isolamento do patógeno na hemocultura com seu perfil de sensibilidade “in vitro” aos antimicrobianos (ATB pós isolamento - > 48hs). Apenas 5 das 15 condutas avaliadas foram consideradas adequadas e 3 foram corrigidas após o isolamento do patógeno na hemocultura e o conhecimento da sua sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos. A antibióticoterapia de 7 pacientes foi mantida ou alterada inadequadamente apesar dos antimicrobianos de escolha apresentarem resistência *in vitro*. Tais condutas foram consideradas inadequadas e podem estar relacionadas com o óbito de três pacientes (1, 3 e 15).

Tabela 11 – Dados demográficos e clínicos dos pacientes com bacteremia por *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida à cefepima e/ou teste fenotípico positivo para ESBL.

Nº Pcte ^a	Idade, Sexo	Gravidade doença base ^b	Unidade internação	Infecção nosocomial	Bacteremia (fonte)	Cateter venoso central	ATB prévio ^c	ATB coleta (48hs) ^d	ATB pós isolamento (>48hs) ^e	Conduta terapêutica	Óbito
1	74,M	DRF	UTI geral	sim	1 ^a		CRO	CRO	CRO	inadequada	sim
2	49,M	DPF	Gastrocirurgia	sim	2 ^a (I)		CRO	CRO	IMP	corrigida	não
3	76,M	DPF	UTI geral	sim	1 ^a		CRO	FEP	-	inadequada	sim
4	60,M	DRF	UTI geral	sim	1 ^a		IMP	IMP	IMP	adequada	sim
5	27,F		Neurocirurgia	sim							
6	33,M	DPF	Cirurgia cardíaca	sim	2 ^a (P)	X	IMP	IMP	IMP	adequada	não
7	65,M	DPF	UTI geral	sim	2 ^a (P)		CRO, OXA	CRO	IMP	corrigida	

-
- a – Pacientes em negrito (9, 10, 11, 12 e 16) apresentaram fenótipo positivo para a produção de ESBL;
- b - Gravidade da doença de base definida segundo os critérios descritos por McCabe & Jackson (1962): doença rapidamente fatal (DRF), doença potencialmente fatal (DPF) e doença não fatal (DNF);
- c - Utilização de algum antimicrobiano até 10 dias anteriores à coleta da hemocultura;
- d - Antibióticoterapia empírica introduzida imediatamente após a suspeita de bacteremia e coleta da hemocultura;
- e - Antibióticoterapia mantida ou alterada de acordo com o patógeno isolado na hemocultura (aproximadamente 48 hs após a coleta);
- f - Isolados sensíveis à cefepima (15 – MIC 8µg/ml; 16 – MIC 2µg/ml);
- Abreviaturas:** N. Pcte, número do paciente; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; IMP, imipenem; AK, amicacina; CRO, ceftriaxona; VANCO, vancomicina; OXA, oxacilina; MERO, meropenem; POLI, polimixina; SUL/TRIM, sulfametoxazol/trimetoprim; LEVO, levofloxacina; CIP, ciprofloxacina; IOP, Instituto de Oncologia Pediátrica; UTI, unidade de terapia intensiva; 1^a, bacteremia primária; 2^a, bacteremia secundária; P, pulmão; I, indeterminada.

5 – DISCUSSÃO

As infecções de corrente sanguínea (ICS) são importantes causas de morbidade e mortalidade em todo mundo. Com base nos certificados de óbito, essas infecções estão entre as dez causas de morte mais frequentes nos Estados Unidos. Estima-se que ocorram aproximadamente 250.000 casos de ICSs nosocomiais anualmente (Pittet, 1997). Estudos recentes reportam que a incidência das ICSs está entre 1% nos pacientes de unidades de terapia intensiva (UTI) (Warren *et al.*, 2001) e 36% nos pacientes com transplante de medula óssea (Collin *et al.*, 2001). As ICSs em pacientes de UTI estão associadas a uma mortalidade atribuída de 35%, um aumento de 24 dias na internação, e um adicional no custo hospitalar de 40.000 dólares por sobrevivente (Pittet *et al.*, 1994).

Dados do programa NNIS (*National Nosocomial Infection Surveillance*), gerados por 80 centros médicos americanos de 1980 a 1992, e dados europeus mostram um aumento na incidência de bacteremias (Jarvis & Martone, 1992; Pittet *et al.*, 1994; Fluit *et al.*, 2000). As bacteremias primárias constituem mais de 13% de todas as infecções adquiridas no hospital, e a epidemiologia dos patógenos responsáveis por essas infecções tem mudado drasticamente nos últimos 15 anos (Jarvis & Martone, 1992; Vincent *et al.*, 1995).

O gênero *Enterobacter* está entre os principais patógenos comumente associados a infecções de corrente sanguínea. O programa NNIS mostra que o *Enterobacter* spp. foi responsável por 5 a 7% de todas as bacteremias nosocomiais nos Estados Unidos entre 1976 e 1989 (Jarvis & Martone, 1992). Em 1999, esse mesmo programa destacou a importância desse patógeno nas unidades de terapia intensiva mostrando que o *Enterobacter* spp. foi o quinto patógeno e a primeira bactéria Gram negativa mais frequentemente isolada de bacteremias (4,9% de 21.943 isolados) (NNIS, 1999).

Na América Latina, dados do Programa SENTRY coletados entre 1997 e 2001 demonstraram que o *Enterobacter* spp. foi responsável por 5,7% das bacteremias, estando entre os seis patógenos mais comumente isolados durante os 5 anos do estudo (Sader *et al.*, 2004). Nos hospitais brasileiros, o *Enterobacter* spp. foi o quinto patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea no período de 1997 a 1999 (Sader, 2001). Dados europeus são semelhantes aos das outras regiões, com o *Enterobacter* spp. como sétimo microrganismo mais frequentemente isolado de ICSs (Fluit *et al.*, 2000).

O presente estudo mostrou uma alta incidência de bacteremias por *Enterobacter* spp. em pacientes internados nas unidades pediátricas do HSP (47,3%). A maior parte dessas infecções parece surgir de sítios endógenos previamente colonizados do paciente, como o trato gastrointestinal de pacientes saudáveis e do trato urinário e respiratório de pacientes hospitalizados, principalmente aqueles com terapia antimicrobiana prévia (Sanders & Sanders, 1997). Outra provável fonte, especialmente em neonatos, seria a disseminação das cepas de *Enterobacter* spp. através de soluções intravenosas contaminadas, soluções de nutrição parenteral, equipamentos médicos, ou através dos profissionais de saúde (Harbarth *et al.*, 1999; van den Berg *et al.*, 1999; Tresoldi *et al.*, 2000). Além disso, alguns autores descrevem a possibilidade da contaminação dos neonatos durante o parto, já que o isolado de *Enterobacter* spp. pode ser proveniente da flora intestinal da mãe que recebeu terapia antimicrobiana durante a gravidez (Calil *et al.*, 2001; Talon *et al.*, 2004).

As taxas de bacteremias por *Enterobacter* spp. em pacientes internados na UTI geral e aqueles internados na UTI pediátrica do HSP, durante o período avaliado, foram de 9,7 e 6,5%, respectivamente. Os pacientes internados em unidades de terapia intensiva possuem um risco aumentado de se infectarem por *Enterobacter* spp. por diversos fatores, tais como: hospitalização prolongada, complexidade das condições de base, imunossupressão, prematuridade ou baixo peso ao nascer, presença de cateteres (cateter venoso central, tubo endotraqueal, cateter urinário), e, principalmente, o uso prévio de antimicrobianos (Sanders & Sanders, 1997; Lee *et al.*, 2002).

O Programa SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance*), num estudo realizado em 49 hospitais americanos durante 7 anos, mostrou que as espécies de *Enterobacter* spp. são mais freqüentemente isoladas de pacientes em UTIs, do que nas outras unidades de internação (4,7% bacteremias em UTI vs 3,1% bacteremias nas outras unidades), ocupando o sexto lugar entre os principais patógenos relacionados a ICS em UTI (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Os dados do programa NNIS são semelhantes aos do Programa SCOPE com 4,9% das bacteremias em UTIs causadas por *Enterobacter* spp., sendo que a UTI mais freqüente é a de era dodoascsuniv,adv UT ddot emulizadan

ICS em pacientes cirúrgicos, com 59% das bacteremias causadas por microrganismos Gram-negativos, além de alta prevalência de bacteremias por *Acinetobacter* spp. e *Enterobacter* spp. em pacientes graves não-neutropênicos. Eles relacionam essas infecções a focos distantes no organismo, à manipulação inadequada do cateter venoso central e à transmissão cruzada entre os pacientes como resultado da baixa aderência às medidas de controle de infecção.

A distribuição das amostras de infecção de corrente sanguínea por *Enterobacter* spp. avaliados no HSP e no IOP mostrou uma concentração desses isolados nas unidades relacionadas à pediatria. Entretanto o número de isolados resistentes aos antimicrobianos, especialmente cefalosporinas, foi preocupante entre as amostras das outras unidades, principalmente das UTIs, onde a resistência chegou a 66,7% para ceftazidima e 46,7% para cefepima (33,3% e 53,3% de sensibilidade, respectivamente) (Figura 4). A alta sensibilidade a esses antimicrobianos encontrada nas amostras pediátricas (92,9% para ceftazidima; 95,2% para cefepima) pode ser devida a um número mais restrito de antibióticos que podem ser utilizados em crianças, já que esses pacientes demandam cuidados especiais, exigindo maior racionalidade na prescrição dos antimicrobianos. Esse dado também sugere que as cefalosporinas de amplo espectro possam ser utilizadas com maior segurança entre os pacientes pediátricos, evitando o uso de outros agentes que são fortes indutores de resistência como os carbapenens.

A seleção de microrganismos resistentes tem sido favorecida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos no ambiente hospitalar. Esse fato é especialmente claro entre as *Enterobacteriaceae*, inclusive entre as espécies de *Enterobacter* spp.. Estudos realizados em centros médicos americanos relataram a importância do gênero *Enterobacter* ao observarem que esse microrganismo possuía as mais altas taxas de resistência comparado às outras enterobactérias para cada agente antimicrobiano avaliado, exceto à ciprofloxacina e ao imipenem (Edmond *et al.*, 1999; Rhomberg *et al.*, 2004). Rhomberg e colaboradores (2004), ao comparar taxas de sensibilidade do ano de 1999 com 2001, também reportaram que, entre as principais enterobactérias, apenas o *Enterobacter* spp. mostrou uma consistente tendência à diminuição na sensibilidade aos agentes testados.

Os dados apresentados neste estudo indicam que, de janeiro de 2003 a março de 2004, 28% dos 93 isolados de bacteremia por *Enterobacter* spp. foram resistentes à

ceftazidima (72% sensibilidade). Esses achados são semelhantes àqueles apresentados pelo Programa SENTRY em hospitais brasileiros (73,3% de sensibilidade) e em hospitais europeus (73,1% de sensibilidade) (Fluit *et al.*, 2000; Sader *et al.*, 2004).

O Programa SCOPE (Wisplinghoff *et al.*, 2004) e o Sistema NNIS (NNIS, 1999) reportaram taxas maiores de resistência à ceftazidima entre isolados de *Enterobacter* spp. (38,9 e 36,4%, respectivamente) comparadas àquelas do presente estudo (28%). A porcentagem de amostras resistentes a esse antimicrobiano, apresentada pelo Programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test information Collection Programme*) na Europa (Pfaller *et al.*, 2002) e pelo Programa SENTRY na América Latina (Sader *et al.*, 2004), também foi elevada (34 e 38,5%, respectivamente). A diminuição da sensibilidade à ceftazidima em isolados das UTIs de hospitais europeus tem sido reportada, variando de 26% na Suíça a 31-48% na Bélgica, França, Portugal e Espanha (Hanberger *et al.*, 1999). Uma taxa ainda mais alta foi descrita em UTIs da Turquia (68% de resistência a ceftazidima) (Aksaray *et al.*, 2000).

Entre os sete agentes antimicrobianos testados neste estudo, a ordem decrescente de atividade (% sensibilidade) contra os 93 isolados testados foi: imipenem (100%) > amicacina (86,0%) > cefepima (84,9%) = gatifloxacina (84,9%) > piperacilina/tazobactam (81,7%) > ceftazidima (72,0%) > cefotaxima (68,8%). Apesar de o número de isolados sensíveis para cefotaxima ter sido menor do que aqueles para ceftazidima, a taxa de resistência a esse último antimicrobiano foi mais elevada devido ao maior número de amostras consideradas intermediárias à cefotaxima. Entre todos os isolados avaliados, 30,1% (28) deles apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados e, apesar de 64,5% (60) das amostras terem sido sensíveis a todos os antibióticos, 16,1% (15) foram resistentes a quatro agentes ou mais; nenhum dos isolados apresentou resistência aos sete antimicrobianos concomitantemente.

O número de isolados sensíveis à cefepima encontrado no presente estudo (84,9%) foi consideravelmente menor se comparado a outros estudos relatados na literatura. Em 1997, um estudo nacional avaliou a atividade da cefepima em isolados clínicos de 18 hospitais brasileiros, demonstrando a superioridade da cefepima, com relação à atividade e à potência dessa droga frente às outras cefalosporinas (Sader *et al.*, 1997). Entre as espécies de *Enterobacter*, a cefepima inibiu o crescimento de até 98% dos isolados e foi de 2 a 8 vezes mais potente que as cefalosporinas de terceira

geração. Outro estudo realizado em centros médicos da América Latina entre 1997 e 2001 apresentou, também, altas taxas de sensibilidade à cefepima em amostras de *Enterobacter* spp. (90,3%-América Latina e 92,1%-Brasil) (Sader *et al.*, 2004). Dados dos Estados Unidos e da Europa mostraram taxas ainda maiores de sensibilidade para esse agente, variando entre 94,2 e 100% de sensibilidade (Pfaller *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003; Nijssen *et al.*, 2004; Rhomberg *et al.*, 2004). Além da atividade, a potência da cefalosporina de quarta geração entre as amostras avaliadas nesse trabalho (MIC 50/90 - 0,09/ 32µg/ml) também foi relativamente menor do que aquela apresentada nos hospitais brasileiros nos anos anteriores (0,064/ 3,0µg/mL) (Sader *et al.*, 1997).

Entre os anos de 1997 e 1999, o Programa SENTRY relatou 80% de sensibilidade à cefepima em amostras produtoras de β -lactamase cromossomal induzível resistente à ceftazidima, coletadas em hospitais brasileiros, incluindo o HSP (Sader *et al.*, 2001). Dados de 2003 e 2004, do presente estudo, sugerem queda significativa na sensibilidade à cefalosporina de quarta geração entre os isolados *Enterobacter* spp. do HSP resistentes à ceftazidima (46,2%) (Tabela 7), os quais apresentaram aumento na MIC₅₀-cefepima de 0,09 µg/mL (isolados sensíveis à ceftazidima) para 16 µg/mL (isolados resistentes à ceftazidima). Dados de hospitais dos Estados Unidos mostraram taxas de sensibilidade à cefepima entre isolados resistentes à ceftazidima que variaram de 94,2 a 97,3% nos anos de 1997 a 2000 (Jones *et al.*, 2003). Nesse mesmo período, o Programa MYSTIC na Europa reportou achados semelhantes, com 93,4% dos isolados sensíveis à cefepima e resistentes à ceftazidima (Pfaller *et al.*, 2002). A taxa de resistência ao aminoglicosídeo nesses isolados (50%) também foi maior que a mesma relatada nos outros estudos (Pfaller *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003). Apesar de a combinação com inibidor de β -lactamase piperacilina/tazobactam ter apresentado atividade contra apenas 42,3% dos isolados resistentes à ceftazidima, esse percentual de sensibilidade foi consideravelmente alto comparado àqueles observados nas amostras do Brasil (15,8%) (Sader *et al.*, 2001), dos EUA (15,8 - 26,3%) (Jones *et al.*, 2003) e da Europa (19,1%) (Pfaller *et al.*, 2002). Essa “maior” atividade da piperacilina/tazobactam, associada à baixa sensibilidade da cefepima nesses isolados se deve, possivelmente, à produção de ESBL como um mecanismo concorrente na resistência.

Outro antimicrobiano que apresentou co-resistência importante com a cefalosporina de terceira geração foi a gatifloxacina, representando as quinolonas (50%

de resistência), a qual, assim como a amicacina, mostrou boa atividade entre os isolados de *Enterobacter* spp. em geral (84,9 e 86% de sensibilidade, respectivamente). Alguns autores reportam que a exposição prévia à fluorquinolona está associada ao isolamento de organismos resistentes às cefalosporinas de amplo espectro (Antaniadou *et al.*, 1997; White *et al.*, 1997; Talon *et al.*, 2000).

Notavelmente, o imipenem foi o único agente capaz de inibir o crescimento de mais da metade dessas amostras de *Enterobacter* spp. AmpC desreprimidas (100% de sensibilidade).

Em particular neste estudo, a avaliação da atividade *in vitro* dos agentes antimicrobianos contra isolados resistentes à ceftazidima revelou que 50 a 57,7% dos isolados resistentes à cefalosporina de terceira geração apresentaram resistência cruzada com outros antimicrobianos como piperacilina/tazobactam, amicacina, gatifloxacina e, especialmente, cefepima. Essa alta resistência observada é preocupante e pode comprometer a utilidade desses antimicrobianos como alternativa à cefalosporina no tratamento de muitas infecções. Esses dados sugerem que múltiplas resistências podem ser carregadas no mesmo elemento genético móvel (p.ex., plasmídeo ou integron), resultando em altos níveis de co-resistência em *Enterobacter* spp.. Portanto, mais esforços devem ser feitos para controlar esses isolados resistentes, incluindo reconhecimento microbiológico rápido do fenótipo de resistência, práticas rigorosas de isolamento quando amostras produtoras de AmpC são detectadas, e elaboração de manual de política antimicrobiana para limitar o uso excessivo de certos agentes β -lactâmicos de amplo espectro que têm sido documentados como potentes indutores de mutantes estavelmente desreprimidos (Ballow & Schentag, 1992; Pfaller *et al.*, 1997). À luz da excelente atividade do carbapenem frente a esses isolados produtores de β -lactamases AmpC desreprimidos, é razoável que se considere esse agente como antibiótico de primeira linha no tratamento de infecções graves por *Enterobacter* spp..

Com relação aos isolados resistentes à cefepima comparados às amostras resistentes a ceftazidima e àquelas sensíveis a esses dois agentes, a redução na atividade dos antimicrobianos piperacilina/tazobactam (7,1% de sensibilidade), amicacina (28,6%) e gatifloxacina (21,4%) foi ainda mais brusca (Tabela 7), o que também limita o tratamento para uma única classe antimicrobiana, os carbapenens.

No final da década de 90, alguns autores começaram a relatar um aumento na taxa de *Enterobacter* spp. resistentes às cefalosporinas de terceira geração (NNIS, 1999; Rhomberg *et al.*, 2004). Há múltiplos mecanismos envolvidos na resistência das *Enterobacteriaceae* às cefalosporinas de terceira geração, e um simples isolado pode exibir mais do que um mecanismo. Entre as cepas clínicas de *Enterobacter* spp., o principal mecanismo de resistência é através da produção de β -lactamases. Estas enzimas podem ser codificadas por genes plasmidiais e cromossomais. As β -lactamases cromossomal AmpC desreprimida são comuns nos isolados de *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* e *Providencia* spp. (Jones *et al.*, 1997). Os altos níveis de β -lactamases produzidas pelo mecanismo AmpC são suficientes para conferir resistência a quase todos os β -lactâmicos usados clinicamente, com exceção dos carbapenems e das cefalosporinas de quarta geração, como a cefepima e a cefpiroma (Jones, 1998). A cefepima, diferente da ceftazidima, pode permanecer ativa contra mutantes produtores de AmpC devido a sua alta velocidade de penetração pela membrana externa e maior estabilidade à degradação por esse tipo de β -lactamase (Hancock & Bellido, 1992).

A desrepressão do gene *ampC* e conseqüente hiper-produção de β -lactamases se deve a uma mutação no gene cromossomal *ampD* que, normalmente, previne altos níveis da expressão dessas β -lactamases por esses organismos (região regulatória do gene *ampC*) (Sanders, 1992; Chen, Yuan & Livermore, 1995). Tais mutantes *ampD* têm sido, freqüentemente, referidos como mutantes estavelmente desreprimidos. Outras proteínas, como a AmpG e a AmpR, parecem também estar envolvidas na indução dessas β -lactamases da classe C ou grupo 1 de Bush (Jacob *et al.*, 1995; Normark, 1995; Park, 1995). O aumento da prevalência na resistência às cefalosporinas de amplo-espectro entre as espécies de *Enterobacter* parece estar associada ao aumento do uso dos mais novos β -lactâmicos (Gallagher, 1990; Chow *et al.*, 1991). Está estabelecido que esses mutantes desreprimidos podem ser selecionados durante a terapia com β -lactâmicos, especialmente carbapenems e cefalosporinas de amplo espectro como a ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona (Stapleton *et al.*, 1995b; Jones, 1998).

Mutantes com altas taxas de resistência às cefalosporinas de terceira geração estão, geralmente, presentes em baixos níveis (1 em 10^{-6} a 10^{-7}) na flora intestinal do paciente, e a seleção durante a terapia permite a proliferação subseqüente desses

mutantes resistentes. Stearne e colaboradores (2004) mostraram que mutantes resistentes de *E. cloacae* são preferencialmente selecionados *in vitro* com 2 a 64 µg de ceftizoxima, uma cefalosporina de amplo espectro, e *in vivo* com 12 a 384 mg/kg/dia dessa droga.

A expressão de β-lactamases de espectro ampliado codificadas por plasmídios (ESBLs) está disseminada em quase todos os Gram-negativos, sendo predominante na *Escherichia coli* e na *Klebsiella* spp. e, recentemente, descrita nas espécies de *Enterobacter*. Essas enzimas conferem resistência aos monobactâmicos (aztreonam) e às oximino cefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefepima). Existem aproximadamente 150 distintas ESBLs que têm sido caracterizadas e classificadas com base na seqüência genética dos aminoácidos. As β-lactamases TEM são o tipo mais comum, mas um crescente número de enzimas SHV, OXA e CTX-M tem sido também identificado (<http://www.lahey.org/studies/webt.stm>).

Em *Enterobacteriaceae*, a resistência aos β-lactâmicos de amplo espectro, através da produção de ESBL, está correlacionada ao uso de antimicrobianos, principalmente à administração de algumas cefalosporinas de terceira geração (Jacobson *et al.*, 1995; Kaye *et al.*, 2001). Uma potente ligação causal entre resistência e cefalosporinas de terceira geração é evidenciada quando, ao restringir a utilização desses agentes, ocorre uma diminuição dos isolados clínicos produtores de ESBLs (Calil *et al.*, 2001).

A emergência de ESBLs nas espécies de *Enterobacter* é inesperada, dada a alta propensão deste gênero de gerar mutantes produtores de β-lactamases do grupo 1 estavelmente desreprimidos. Entretanto, algumas espécies de *Enterobacter*, como *E. gergoviae*, *Enterobacter agglomerans* (*Pantoea agglomerans*) e alguns *E. sakazakii*, não se adaptam rapidamente à indução ou desrepressão da AmpC cromossomal. O primeiro relato de ESBL em *Enterobacter*, na Espanha, foi num isolado de *E. gergoviae*, em 1991, e um achado semelhante foi feito na China (Cheng & Chen, 1994). Como a resistência relacionada a AmpC não é esperada nessas espécies, a produção de ESBLs pode constituir a principal estratégia de resistência às cefalosporinas de amplo espectro. É sabido que a hiperprodução de β-lactamase cromossomal como resultado de uma mutação pode estar associada a um custo biológico significativo para o organismo produtor (Negri & Baquero, 1998). Se um plasmídio carreador de ESBL está presente no ambiente, e sua expressão é de menor custo do que a hiperprodução

da enzima cromossomal, então há uma clara oportunidade para a aquisição de plasmídios carreadores de ESBL. Esse evento pode trazer benefícios extras como a aquisição de resistência a outros antibióticos, além de que a combinação dessas enzimas com as β -lactamases AmpC permite que essas espécies sejam resistentes às cefalosporinas de quarta geração.

Apesar de haver poucos estudos similares na literatura, a frequência de isolados com fenótipo positivo para a produção de ESBL (5,4% - 5 dos 93 *Enterobacter* spp.), no presente estudo, foi semelhante àquela de alguns hospitais americanos (D'Agata *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 2002), onde a maioria das espécies de *Enterobacter* avaliadas foram também de *E. cloacae*, o qual parece ter menor probabilidade de adquirir este tipo de resistência do que o *E. aerogenes* (Mendes *et al.*, 2000; Talon *et al.*, 2000; Levison *et al.*, 2002; Aibinu *et al.*, 2003). Todavia, considerando apenas as amostras resistentes às cefalosporinas de amplo espectro, a produção de ESBLs (19,2%) foi maior do que a mesma relatada num estudo francês (10,8%) (Talon *et al.*, 2000).

O programa de Vigilância Antimicrobiana MYSTIC avaliou a produção de ESBL entre 176 enterobactérias isoladas de pacientes internados em UTIs de hospitais brasileiros. Entre as bactérias avaliadas, 29% eram produtoras de ESBL, sendo a *Klebsiella pneumoniae* a espécie mais prevalente (59,2%), seguida do *Enterobacter* spp. (19,5%) e *E. coli* (14,6%) (Mendes *et al.*, 2000). Entre as espécies de *Enterobacter* avaliadas por Mendes e colaboradores (2000), o *E. aerogenes* foi o microrganismo do gênero mais frequentemente associado à produção de ESBLs. Aibinu e colaboradores (2003) também mostraram uma alta frequência de ESBLs em isolados de *E. aerogenes* (25%; 6 de 24) comparada a mesma avaliada em isolados de *E. cloacae* (12,5%; 2 de 16). Esse achado assemelha-se a publicações mais antigas, as quais também documentaram baixa produção de ESBL em *E. cloacae* (Coudron *et al.*, 1997; Emery & Weymouth, 1997; Pitout *et al.*, 1998).

As ESBLs mais comumente encontradas entre as enterobactérias produtoras de β -lactamases AmpC induzíveis pertencem aos grupos TEM e SHV de β -lactamases. As espécies de *Enterobacter* têm adquirido plasmídios que codificam para uma variedade de ESBLs distribuídas em diversos países, incluindo a China (Chanawong *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2003), França (De Champs *et al.*, 1991; Neuwirth *et al.*, 1996; De Champs *et al.*, 2000), Reino Unido (Hibbert-Rogers *et al.*, 1995), EUA (Rice *et al.*, 1990; Pitout *et al.*, 1998; Levison *et al.*, 2002), Grécia (Kartali *et al.*, 2002), México (Silva *et al.*, 1999),

Austrália (Gottlieb & Wolfson, 2000), Brasil (Bonnet *et al.*, 2000; Bonnet *et al.*, 2001) Tailândia (Girlich *et al.*, 2001) e Espanha (Varela *et al.*, 2001; Cantón *et al.*, 2002). Essas ESBLs encontradas em *Enterobacter* spp. são enzimas do tipo TEM (TEM-3, TEM-10, TEM-12, TEM-24, TEM-26), SHV (SHV-3, SHV-4, SHV-5, SHV-7, SHV-12) e, mais recentemente, da classe CTX-M (Bonnet *et al.*, 2000; Doucet-Populaire *et al.*, 2000; Bonnet *et al.*, 2001; Cantón *et al.*, 2002; Chanawong *et al.*, 2002). ESBLs do tipo VEB-1 foram reportadas em *Enterobacter* spp. da Tailândia (Girlich *et al.*, 2001), IBC-1 na Grécia (Kartali *et al.*, 2002) e SFO-1 no Japão (Matsumoto & Inoue, 1999).

Nos isolados de *Enterobacter* spp. ESBL positivos deste estudo, as MICs de cefotaxima foram, em geral, maiores do que aquelas de ceftazidima. Na América Latina e, particularmente no Brasil, a cefotaxima tem sido descrita como um dos principais substratos para detecção de amostras produtoras de ESBL em outros gêneros (*E. coli* e *K. pneumoniae*), pois, geralmente, as β -lactamases presentes nessa região geográfica são derivadas da família das cefotaximases (Bauernfeind, 1992; Bonnet, 2000; Carmo, 2003; Pereira, 2003). Frente a esses fatos e à facilidade de disseminação dessas enzimas entre as bactérias, inclusive entre espécies de diferentes gêneros, pode-se supor que a maioria das ESBLs detectadas fenotipicamente neste estudo correspondam a β -lactamases da classe CTX-M (cefotaximases).

Os isolados produtores de ESBL são, geralmente, resistentes a vários outros antibióticos, incluindo gentamicina, amicacina, tobramicina, ciprofloxacina e outras quinolonas, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim (Jarlier *et al.*, 1988; Thornsberry *et al.*, 1993; Talon *et al.*, 2000; Aibinu *et al.*, 2003). O estudo de Aibinu e colaboradores (2003) demonstrou que as enzimas mais freqüentemente encontradas em isolados de *Enterobacter* spp. foram as β -lactamases do tipo SHV-2 (pI 7,6), as quais eram transferidas juntamente com a resistência à gentamicina, à ampicilina, e a sulfametoxazol-trimetoprim, sugerindo que os genes responsáveis por essas ESBLs são carregados no mesmo plasmídio que os genes responsáveis por esses antimicrobianos. Em centros de saúde franceses, Arpin e colaboradores (2003) mostraram alta freqüência de ESBLs em *Enterobacter aerogenes*. A maioria delas eram enzimas TEM-24b codificadas por um grande plasmídio e, também, associado à co-transferência de resistência aos aminoglicosídeos, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim. Se analisarmos os isolados resistentes às cefalosporinas de amplo

espectro, comparados às cepas selvagens (sensíveis às cefalosporinas) deste estudo, os achados de co-resistência a outras classes de antimicrobianos, apresentados aqui e por outros autores, são semelhantes (Talon *et al.*, 2000). No entanto, no que diz respeito apenas aos isolados produtores de ESBL, o que se observou foi um aumento na sensibilidade das classes de antibióticos não β -lactâmicos, principalmente da nova quinolona gatifloxacina, a qual inibiu o crescimento de quatro das cinco amostras ESBL positivas. Nesse caso, seria interessante a realização de um estudo com maior número de isolados para avaliar com mais segurança a co-seleção de resistência entre isolados produtores de ESBL.

A sensibilidade à piperacilina-tazobactam entre amostras ESBL positivas pode ser um marcador da presença da enzima ESBL na ausência da desrepressão estável do gene *ampC* (hiperprodução de β -lactamase cromossomal AmpC), enquanto que a resistência a esta droga é consistente com a presença de ambas as enzimas. Esse fato é afirmado em duas amostras produtoras de ESBL que apresentaram sensibilidade à piperacilina-tazobactam (amostras 12 e 16). Apesar da resistência *in vivo*, um desses isolados apresentou, *in vitro*, sensibilidade à cefepima, e o outro apresentou sensibilidade intermediária a este antimicrobiano (isolados 16 e 12, respectivamente), demonstrando a importância do teste fenotípico, já que apenas o perfil de sensibilidade da cefalosporina de quarta geração nem sempre é um bom indicador da presença de ESBL.

Do ponto de vista clínico, a discriminação entre ESBLs e a hiper-produção de β -lactamases AmpC parece não ser crítica, já que as opções terapêuticas para infecções causadas por microrganismos que possuem algum desses mecanismos de resistência são similarmente limitadas. Entretanto deve-se considerar que o uso da cefalosporina de quarta geração para o tratamento de infecções causadas por bactérias sabidamente não produtoras de ESBL pode ser extremamente útil quando comparada à terapia pelos carbapenens, os quais, além de serem fortes agentes indutores da produção de β -lactamases AmpC, seu uso indiscriminado tem sido associado a um aumento na emergência de cepas resistentes a esses antimicrobianos no ambiente hospitalar, principalmente entre bactérias Gram-negativas não-fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa*. Deve-se considerar também a importância de se conhecer a microbiologia local, seja ela do hospital como um todo ou de suas unidades separadamente, por exemplo, ao analisar os resultados deste estudo, a cefepima poderia ser uma boa

opção terapêutica entre os *Enterobacter* spp. isolados em crianças (Tabela 8), no entanto essa droga deve ser usada com precaução contra as amostras de pacientes adultos, especialmente aqueles internados nas unidades cirúrgicas ou de terapia intensiva (Figura 4), os quais parecem possuir maior propensão a infecções por *Enterobacter* spp. produtores de β -lactamases AmpC estavelmente desreprimidos (resistentes às cefalosporinas de terceira geração). Além da possibilidade da escolha de melhores opções terapêuticas com o conhecimento do fenótipo de resistência, a detecção dessas ESBLs “escondidas” é de extrema importância epidemiológica no hospital devido à facilidade de disseminação da resistência entre os pacientes.

Um fato interessante observado entre as amostras resistentes à cefepima e produtoras de ESBL deste estudo foram os valores das MICs de ceftazidima e, principalmente, de cefepima que se apresentaram relativamente mais baixos comparados às concentrações dos isolados resistentes à cefepima e não produtores de ESBL. Isso sugere que a presença de MICs mais altos para a cefalosporina de quarta geração pode ser um fator presuntivo para a presença de outros mecanismos de resistência a esta droga que não a produção de ESBL.

No presente estudo, oito de 15 isolados com sensibilidade reduzida à cefepima tiveram altas MICs para cefepima e apresentaram fenótipo negativo para a produção de ESBL. Esses dados são semelhantes a estudos anteriores, nos quais altos níveis de resistência à cefepima foram reportados em isolados clínicos de *Enterobacter* spp. com hiper-produção de enzimas AmpC associado à alteração na permeabilidade de membrana e/ ou mecanismos de efluxo ativo (Charrel *et al.*, 1996; Mallea *et al.*, 1998; Gayet *et al.*, 2003; Bornet *et al.*, 2004; Chollet *et al.*, 2004; Thiolas *et al.*, 2004). Além disso, um novo mecanismo de resistência à cefepima, envolvendo mudanças na estrutura da cefalosporinase AmpC, foi recentemente descrito num isolado de *E. aerogenes* (Barnaud *et al.*, 2004).

Um laboratório francês mostrou a relação da resistência à cefepima e ao imipenem com a deficiência ou mutação na síntese da porina Omp36 de *Enterobacter aerogenes* (Charrel *et al.*, 1996; Thiolas *et al.*, 2004). Esse mesmo grupo também associou altas taxas de resistência às cefalosporinas de amplo espectro, principalmente aquelas carregadas negativamente como a cefotaxima e a ceftazidima, com a diminuição da síntese da porina Omp35 de *Enterobacter aerogenes* (Bornet *et al.*, 2004). Nesse caso, a cefepima e o imipenem são apenas fracamente afetados, o

que pode ser a explicação para a diminuição da sensibilidade à cefepima dos isolados 13 e 14 do presente estudo.

Outro mecanismo que pode coincidir com a perda de porina e está relacionado à resistência a vários antimicrobianos, como β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol (*multidrug resistance* - MDR), é o efluxo ativo de drogas (Gambino *et al.*, 1993; Mallea *et al.*, 1998). Em *E. aerogenes*, assim como em outras enterobactérias, tem sido descrito que alguns componentes da regulação da cascata do sistema MDR, por um lado, regulam negativamente (*downregulation*) a expressão de porinas não específicas da membrana externa (OmpF, OmpC) e de alguns genes envolvidos na biossíntese de lipopolissacarídeos e, por outro lado, induzem a super-produção da bomba de efluxo AcrAB-TolC (Alekhshun & Levy, 1997; Barbosa & Levy, 2000; Chollet *et al.*, 2004), a qual está associada a resistência às quinolonas em *E. coli* e *E. cloacae* (Maneewannakul & Levy, 1996; Linde *et al.*, 2002). Portanto a resistência concomitante à gatifloxacina nos isolados resistentes às cefalosporinas de amplo espectro deste estudo (isolados 1 a 8) pode supor a presença desses mecanismos. Além disso, essa duplicidade de mecanismos na ativação do MDR pode explicar a rápida resposta e a eficiência adaptativa do *Enterobacter* spp. durante o tratamento antimicrobiano e a emergência de cepas MDR *in vivo* (Bornet *et al.*, 2003; Gayet *et al.*, 2003).

Apesar deste estudo ter demonstrado que, devido à alta resistência cruzada, os antibióticos da classe das quinolonas e dos aminoglicosídeos apresentam pouca atividade contra os isolados resistentes às cefalosporinas de amplo espectro, eles ainda podem ser opções terapêuticas úteis entre amostras selvagens de *Enterobacter* spp., ou seja, aquelas sensíveis aos agentes antimicrobianos, inclusive β -lactâmicos. Eles podem ser usados como monoterapia ou associados aos β -lactâmicos, no entanto, semelhantemente a essa última droga, o aumento do consumo de quinolonas e aminoglicosídeos, nas últimas décadas, tem levado ao surgimento de cepas resistentes a esses antibióticos.

Entre as quinolonas disponíveis, a gatifloxacina apresenta a melhor atividade contra o *Enterobacter* spp., enquanto a amicacina possui o melhor espectro de sensibilidade entre os aminoglicosídeos. Entre os anos de 1997 a 2001, uma pesquisa realizada em hospitais brasileiros, incluindo o HSP, apresentou 89,5% de sensibilidade a gatifloxacina e, 83,1% de sensibilidade a amicacina em *Enterobacter* spp. isolados de infecções de corrente sangüínea (Sader *et al.*, 2004). Apesar de alguns estudos

realizados em outros países mostrarem um aumento na tendência de resistência às quinolonas nos últimos anos (Livermore *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2002; Mutnick *et al.*, 2004), os dados do presente estudo apontaram que as taxas de sensibilidade, tanto da quinolona quanto do aminoglicosídeo, mantiveram-se estáveis no HSP durante os anos de 2003 e 2004 (84,9 e 86,0% de sensibilidade a gatifloxacina e amicacina, respectivamente) comparados aos achados em hospitais brasileiros no período de 1997 a 2001 (Sader *et al.*, 2004). Entretanto, assim como reportado por Sader e colaboradores (2001), a atividade dessas drogas é significativamente reduzida em cepas produtoras de β -lactamases AmpC cromossomal desreprimida, como descrito anteriormente.

O principal alvo de ação das quinolonas nas bactérias Gram-negativas é a DNA girase, uma topoisomerase do grupo II requerida para a replicação e transcrição do DNA. A DNA girase, a qual é composta por duas subunidades A e duas subunidades B, é codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*. Nesses organismos, a resistência às quinolonas está mais freqüentemente associada a alterações no gene *gyrA*. As mutações estão localizadas na posição 5' terminal do gene (nucleotídeos 199 a 318 da seqüência do gene de *E. coli*) numa região designada de região determinante de resistência em quinolona, ou QRDR (*quinolone resistance-determining region*) (Yoshida *et al.*, 1990). Entre as principais espécies de enterobactérias, o *E. cloacae* apresenta o maior grau de similaridade com a seqüência QRDR do gene *gyrA* de *E. coli* (93,3% de identidade). Os fragmentos do gene *gyrA* de isolados clínicos de *E. cloacae* exibem várias substituições nucleotídicas, resultando em alterações na Ser-83 a Phe, Ile, ou Tyr, sendo que a mais comum está no códon da Ser-83, semelhante ao que ocorre em *E. coli*. Além disso, alto grau de resistência à quinolona em *Enterobacter* spp. pode estar associado a uma única mutação na seqüência QRDR do gene *gyrA* (Weigel *et al.*, 1998).

Outro mecanismo relacionado a níveis maiores de resistência às quinolonas em *Enterobacter* spp. é o aumento na expressão da bomba de efluxo AcrAB associado à mutação na Gyr A (Linde *et al.*, 2002).

Os mecanismos responsáveis pela resistência aos aminoglicosídeos em isolados clínicos de *Enterobacter* spp. têm sido objeto de muitas investigações desde a década de 80 (Lovering *et al.*, 1988; Peyret *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1997). Como em outros membros das *Enterobacteriaceae*, o principal mecanismo de resistência entre cepas de

Enterobacter spp. é devido à produção de uma ou mais enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Existem três classes de enzimas modificadoras: as fosfotransferases (APH), as acetiltransferases (AAC) e as adeniltransferases (ANT) e suas variantes. A presença dessas enzimas foi verificada desde os anos 80 em plasmídios que podiam ser transferidos entre diferentes espécies bacterianas. Nos anos 90, através da utilização de novas técnicas moleculares de detecção e seqüenciamento de genes de resistência, pôde-se concluir que os genes de resistência aos aminoglicosídeos eram genes cassetes inseridos em um integron que, através de transposons e/ou plasmídeos conjugativos, poderiam ser transferidos para diferentes espécies bacterianas (Sallen *et al.*, 1995). Cerca de 70 enzimas já foram identificadas.

Entre as cepas resistentes de *Enterobacter* spp., a presença do fenótipo KTANt (kanamicina, tobramicina, amicacina e netilmicina), indicativo da produção de AAC(6')-I é prevalente (66,7% de resistência) em hospitais da Grécia (Neonakis *et al.*, 2003). As enzimas acetiladoras, incluindo AAC(3)-II (cujo substrato preferencial é a gentamicina, tobramicina e netilmicina), AAC(6')-I (tobramicina, netilmicina e amicacina), AAC(3)-III, AAC(3)-I (gentamicina), e AAC(3)-V (netilmicina), parecem ser freqüentemente encontradas em *Enterobacter* spp.. As enzimas adeniltransferases, ANT(2'') (gentamicina, tobramicina, dibekacina e kanamicina) e ANT(3'') (spectinomomicina) também podem ser encontradas nesse patógeno (Vatopoulos *et al.*, 1992).

Apesar da resistência aos carbapenems já ter sido documentada em algumas espécies de enterobactérias (Poirel & Nordman, 2002), este fenótipo é raramente descrito entre amostras de *Enterobacter* spp. (De Champs *et al.*, 1993; Charrel *et al.*, 1996), mesmo naquelas que apresentam resistência a outros β -lactâmicos. A resistência aos carbapenems nas espécies de *Enterobacter* geralmente está associada à combinação de carbapenemase específica com alteração na permeabilidade de membrana (porina) (Tzouveleki *et al.*, 1992; Bornet *et al.*, 2000). No presente estudo, todos os isolados clínicos de *Enterobacter* spp. foram sensíveis ao carbapenem testado, imipenem.

Os mecanismos de resistência em amostras de *Enterobacter* spp. vêm sendo cada vez mais estudados, porém é necessário que, aliado ao estudo destes mecanismos, se conheça o modo de disseminação desses isolados resistentes. Este estudo avaliou a similaridade genética das amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à

cefepima isoladas de infecções de corrente sanguínea ao longo do ano de 2003 e início de 2004 no Hospital São Paulo e no Instituto de Oncologia Pediátrica.

A análise da similaridade genética dos 14 isolados de *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida a cefepima, realizada pela técnica de ribotipagem automatizada, permitiu a identificação de 7 ribogrupos distintos, sendo que apenas 3 deles foram detectados em mais de um paciente.

O ribogrupo predominante foi o 150-1, incluindo 6 amostras distribuídas em 4 unidades hospitalares distintas do HSP. Esse clone foi identificado primeiramente em uma unidade cirúrgica em janeiro de 2003, persistindo no hospital até junho desse mesmo ano, quando foi isolado na UTI e aparece novamente no ano de 2004 em dois pacientes (relacionados epidemiologicamente) internados na UTI-geral e em um paciente da neurocirurgia. As amostras pertencentes a esse ribogrupo foram, em sua maioria, negativas para a produção de ESBL, porém o isolado de junho/ 2003 da UTI-geral (adulto) apresentou positividade para esse mecanismo de resistência. Em fevereiro/2004, esse clone foi re-identificado em outro paciente, mas sem o fenótipo de resistência para ESBL, sugerindo a perda do plasmídeo que carrega os genes dessas enzimas pelo *E. cloacae*.

Pode-se observar que um dos isolados pertencentes ao ribogrupo 150-1, isolado em abril/ 2003 (amostra 14), apresentou MIC de cefepima mais baixo do que as outras amostras desse mesmo grupo. Isso pode ter ocorrido devido aos diferentes graus de expressão de resistência entre esses isolados, e um dos fatores que pode favorecer essa diferença é a pressão exercida pelos antimicrobianos administrados em cada um dos pacientes nos quais foi isolado o *E. cloacae* do clone 150-1.

A diferença nas MIC dos agentes antibacterianos entre isolados do mesmo clone pode acontecer, pois a caracterização molecular realizada pela técnica de ribotipagem avalia regiões do DNA cromossomal que codificam o RNA ribossomal, o que torna essa metodologia de tipagem incapaz de rastrear mutações que possam ocorrer em outras regiões do DNA, ou a presença de elementos extracromossômicos como plasmídios que codificam a resistência aos antimicrobianos.

O segundo maior ribogrupo (150-2) foi identificado em 2 amostras clínicas que tiveram relação epidemiológica, pois foram isoladas na mesma unidade (UTI-geral) e em datas muito próximas (28/fevereiro/2003 e 02/março/2003). Esse clone parece não

ter permanecido no hospital, já que não foi mais detectado no decorrer do ano de 2003 e 2004.

O ribogruppo 150-8 foi identificado em isolados de dois pacientes no ano de 2003, e, apesar de persistir no HSP de junho a setembro desse ano, essas amostras não apresentaram relação epidemiológica de acordo com os critérios estabelecidos pela CCIH do HSP. Os outros quatro ribogruppos foram isolados em diferentes datas e em unidades hospitalares distintas, inclusive um deles pertencia a uma amostra do IOP.

A contaminação cruzada (disseminação paciente-paciente) ficou evidenciada ao se detectar amostras pertencentes aos mesmos clones (150-1 e 150-2), isoladas em diferentes pacientes internados em uma mesma unidade hospitalar e num curto período de tempo. Essa disseminação clonal aponta para a necessidade urgente de se dar maior ênfase às medidas de controle, como medidas de barreira e lavagem das mãos, na tentativa de se diminuir a ocorrência de infecção cruzada por isolados multirresistentes. Além disso, um trabalho multidisciplinar continuado é de extrema importância na elaboração de estratégias para o controle de infecção, o qual certamente terá um papel relevante na prevenção e no tratamento dessas infecções de maior gravidade.

Apesar do enfoque deste estudo ser a investigação, incluindo a análise da disseminação de isolados de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima, é importante destacar que prováveis surtos podem ter ocorrido com isolados sensíveis a essa droga, principalmente entre pacientes pediátricos, nos quais foi isolado um grande número dessas amostras. A concentração de aproximadamente metade dos isolados clínicos da pediatria nos meses de janeiro e fevereiro de 2004 enriquece essa hipótese. Talon e colaboradores (2004) reportaram um surto por *E. cloacae* sensível as cefalosporinas de amplo espectro em pacientes internados em unidade de prematuros. Eles conferem essa disseminação clonal à alta taxa de transmissão cruzada entre esses pacientes, a qual está correlacionada ao baixo consumo de álcool gel e ao número elevado de intervenções enfermeira-paciente.

O potencial epidemiológico de uma dada cepa depende das características do paciente, da aderência às medidas de controle de infecção hospitalar por parte dos profissionais de saúde, da política antimicrobiana e das propriedades intrínsecas da bactéria com relação à resistência aos antimicrobianos, à adesão, à adaptação e à sobrevivência no ambiente.

Apesar de a prevalência de isolados resistentes às cefalosporinas de amplo espectro ter sido elevada, não foram detectados surtos relevantes de infecções de corrente sanguínea pela epidemiologia molecular no presente estudo. A implementação de programas baseados em precauções de isolamento resulta numa diminuição importante do número de isolados produtores de ESBL, porém não afeta as amostras resistentes aos β -lactâmicos por outros mecanismos. Os isolados resistentes à cefepima ESBL negativos deste estudo foram tipados, e a maioria das amostras não mostrou relação clonal, indicando que, em muitos casos, a infecção surgiu de um reservatório endógeno.

As causas da emergência e disseminação da resistência antimicrobiana são multifatoriais, mas o excessivo e inapropriado uso de antimicrobianos é claramente o principal determinante. Considerando a grande diversidade clonal encontrada neste estudo e a baixa similaridade entre os ribogrupos, pode-se sugerir que a crescente detecção de isolados de *Enterobacter* spp. multirresistentes é devida ao surgimento de novos clones. Esse fato se deve, provavelmente, à pressão exercida pelo uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos, especialmente cefalosporinas de amplo espectro, e alerta para a necessidade da manutenção de uma política rigorosa na utilização de antibióticos no ambiente hospitalar.

O marcante aumento na incidência de infecções devido aos bacilos gram-negativos resistentes nos últimos anos é de grande preocupação em todo mundo. Presume-se que as infecções causadas por isolados de *Enterobacter* spp. resistentes aos antimicrobianos resultam em maior mortalidade, hospitalização prolongada e aumento no custo hospitalar, comparadas àquelas por patógenos (*Enterobacter* spp.) sensíveis (Chow *et al.*, 1991; Blot *et al.*, 2002; Cosgrove *et al.*, 2002). A suposição de que infecções causadas por microrganismos resistentes estão associadas à taxa de mortalidade aumentada é baseada na possibilidade da terapia antimicrobiana adequada para essas infecções ser iniciada mais tarde do que aquelas para infecções causadas por bactérias sensíveis (Ibrahim *et al.*, 2000; Kollef, 2000; Kang *et al.*, 2005). Os achados deste estudo são consistentes com os relatos acima, já que a mortalidade dos pacientes com infecção por *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida à cefalosporina de quarta geração foi maior entre os pacientes com terapia antimicrobiana inadequada (7 pacientes) ou corrigida (3 pacientes), considerando que o óbito de um dos 2 pacientes que receberam antibióticos adequados (paciente 16) está

fortemente relacionado com a gravidade da doença de base, mais do que à própria infecção (Tabela 11).

Em sete pacientes observou-se a inadequação da antibióticoterapia com a persistência na prescrição do antimicrobiano administrado empiricamente, mesmo após a detecção *in vitro* da resistência a este agente, sendo que dois pacientes evoluíram para óbito. Nos pacientes com terapia inadequada que não evoluíram a óbito, mesmo apresentando doença potencialmente fatal ou rapidamente fatal, a bacteremia pode ter sido transitória, ou as outras medidas terapêuticas foram eficientes.

Kang e colaboradores (2005) mostraram que a terapia antimicrobiana inicial empírica inadequada, administrada nas primeiras 48-72 horas, antes do diagnóstico laboratorial, está associada à evolução desfavorável das bacteremias causadas por bactérias gram-negativas resistentes aos antimicrobianos, particularmente naqueles pacientes com um alto risco para adquirir bacteremia e, concluíram que a principal razão da antibióticoterapia ter sido inadequada em *Enterobacter* spp. foi a utilização de cefalosporinas no tratamento de infecções causadas por isolados resistentes a essas drogas.

Apesar de infecções comunitárias terem ocorrido em 3 pacientes avaliados, a maioria das infecções causadas por *Enterobacter* spp. foi nosocomial. Como descrito anteriormente, essas infecções parecem ter emergido de sítios endógenos previamente colonizados do paciente, como o trato gastrointestinal ou outros sítios corporais freqüentemente colonizados por esse patógeno em pacientes gravemente acometidos, especialmente aqueles com antibióticoterapia prévia (Prevot *et al.*, 1986). No presente estudo, 6 dos 9 pacientes com bacteremia primária portavam cateter venoso central, indicando que esses cateteres poderiam estar colonizados pelo *Enterobacter* spp., porém não há dados suficientes (p.ex. cultura do cateter) para afirmar essa hipótese. No que diz respeito às bacteremias secundárias, todas, exceto uma que foi considerada indeterminada, surgiram de um foco infeccioso pulmonar. O *Enterobacter* spp. tem sido reportado como um dos três principais patógenos responsáveis por pneumonias em unidades de terapia intensiva (NNIS, 1999).

O uso prévio de antimicrobianos, especialmente cefalosporinas de amplo espectro, tem sido descrito como um fator predisponente importante no surgimento de resistência em isolados de *Enterobacter* spp. (Chow *et al.*, 1991; Kaye *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2004; Stearne *et al.*, 2004). Ainda é incerto se esses casos

representam a emergência de resistência em isolados selvagens, ou *superinfecção* de uma nova cepa.

Chow e colaboradores (1991) confirmaram, através da tipagem molecular, que isolados inicialmente susceptíveis e aqueles que apresentaram resistência em períodos posteriores foram idênticos, sugerindo que a emergência de amostras resistentes às cefalosporinas de amplo espectro ocorre em 19% dos pacientes que receberam esses antimicrobianos para o tratamento das bacteremias por *Enterobacter* spp.. O estudo desenvolvido por Kaye e colaboradores (2001) também supõe que a frequência de isolados resistentes emerge em 19% dos pacientes tratados com cefalosporinas de amplo espectro. Além disso, um estudo conduzido num hospital francês observou que a aquisição de resistência durante o tratamento da infecção por *Enterobacter* spp. não foi o principal fator na seleção de isolados resistentes; a resistência adquirida foi observada em apenas 3,8% dos pacientes, todos hospitalizados por um longo período de tempo (>40 dias) (Muller *et al.*, 2004). Nesse caso e naqueles relatados por Chow *et al.* (1991) e Kaye *et al.* (2001), a administração das cefalosporinas de amplo espectro, provavelmente, selecionou mutantes resistentes na flora digestiva bacteriana, e essa população selecionada foi considerada a principal responsável pelos processos infecciosos.

O presente estudo demonstrou que os β -lactâmicos foram previamente administrados em 10 dos 12 pacientes que receberam antibióticoterapia prévia e apresentaram resistência às cefalosporinas de amplo espectro, sendo que a ceftriaxona foi o antimicrobiano mais prescrito nesses casos. O estudo de Muller e colaboradores (2004) mostrou uma alta correlação entre o uso prévio de ceftriaxona e o desenvolvimento de resistência em isolados clínicos de *E. cloacae*. Eles atribuem essa relação ao grande impacto desse antimicrobiano na flora digestiva devido à alta eliminação biliar da ceftriaxona comparada às outras cefalosporinas de amplo espectro. Outra possibilidade é que a ceftriaxona possa induzir a desrepressão estável do gene *ampC* mais frequentemente do que as outras cefalosporinas (Fung-Tomc *et al.*, 1996). No estudo de Fung-Tomc e colaboradores (1996), a cefotaxima não mostrou relação entre a utilização prévia e a emergência de isolados resistentes. O trato digestivo é o principal reservatório das *Enterobacteriaceae* envolvidas em infecções. Outras cefalosporinas, como a cefotaxima, cuja maior via de eliminação é renal, devem possuir menos efeitos na promoção da resistência a essas drogas. Essa pode ser uma das

explicações para as baixas taxas de resistência às cefalosporinas de amplo espectro nos pacientes pediátricos deste estudo, já que a cefotaxima é a cefalosporina preferencialmente utilizada nesses pacientes.

Deve-se considerar que, além da antibióticoterapia prévia com cefalosporinas, os pacientes avaliados neste estudo eram, em sua maioria, pacientes com maior risco para adquirir infecções por organismos resistentes, pois apresentavam doenças potencialmente ou rapidamente fatais e estavam internados em unidades críticas como UTIs e unidades cirúrgicas, o que acarreta um número maior de intervenções, mais dias de hospitalização e um número mais elevado de medicamentos administrados, especialmente antimicrobianos.

O controle da resistência bacteriana é complexo e exige atuação em vários setores. As medidas mais eficazes envolvem o controle da disseminação horizontal (paciente-paciente) de bactérias resistentes e a implementação de uma política racional de antimicrobianos, porém, para que essas medidas sejam instauradas de forma adequada, é necessário que se conheça bem a situação de cada hospital.

Inicialmente, os laboratórios devem estar preparados para detectar os mecanismos de resistência mais frequentes em nosso meio. A compreensão de como os diferentes tipos de resistência se disseminam para orientar e otimizar as medidas de controle de infecção, também é importante. Além disso, para que os antimicrobianos sejam utilizados adequadamente, especialmente no tratamento empírico, devem-se conhecer os mecanismos de resistência envolvidos e como eles responderão à pressão seletiva exercida por diferentes classes de antimicrobianos, ou mesmo por diferentes drogas de uma mesma classe. Como existe um grande número de variáveis envolvidas, é importante que as medidas de controle sejam baseadas em estudos locais.

A pesquisa de Hidalgo (2003) chama a atenção para o consumo de antimicrobianos no Hospital São Paulo (1996-2001) e reporta um aumento crescente e significativo no consumo desse antimicrobiano desde sua introdução em 1998. Dessa maneira, medidas para prevenir a disseminação de isolados resistentes à cefalosporina de quarta geração incluem não somente medidas de isolamento e precauções, mas também uma efetiva política de uso racional de antimicrobianos.

Um dos aspectos interessantes de futuros estudos seria a caracterização precisa dos mecanismos envolvidos na resistência à cefepima entre amostras clínicas desse patógeno. Outros temas que também necessitam de uma análise mais profunda são os fatores de risco para a aquisição de *Enterobacter* spp. multirresistentes e a avaliação do papel desempenhado pelos diferentes antimicrobianos β -lactâmicos na seleção desses microrganismos.

6 – CONCLUSÕES

1. O *Enterobacter* spp., particularmente o *E. cloacae*, é um importante patógeno nosocomial isolado em infecções de corrente sanguínea de pacientes internados no Hospital São Paulo e no Instituto de Oncologia Pediátrica. As amostras de bacteremia avaliadas apresentaram altas taxas de resistência à cefalosporina de quarta geração, cefepima, especialmente, entre os pacientes adultos internados em unidades de terapia intensiva ou unidades cirúrgicas.
2. A produção de ESBL nos isolados clínicos de *Enterobacter* spp. avaliados, inclusive entre as amostras resistentes à cefepima, foi pouco freqüente, indicando a forte presença de outros mecanismos de resistência como alteração da permeabilidade de membrana (porina) e/ ou efluxo ativo de drogas.
3. Os resultados da tipagem molecular demonstraram a presença de uma grande variabilidade genômica entre as amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefepima, enfatizando a importância da política do uso de antimicrobianos, adequada à realidade hospitalar local, com o objetivo de restringir a seleção de mutantes resistentes.
4. A análise dos dados epidemiológicos dos pacientes com bacteremias por *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida à cefepima sugeriu a importante correlação entre a utilização prévia de cefalosporinas e a emergência de resistência, assim como a administração da terapia empírica inadequada e a mortalidade aumentada entre esses pacientes.

7 – ANEXOS

Anexo 1. Quadro com os principais dados dos 93 isolados de *Enterobacter* spp. avaliados no estudo.

Banco	Espécie	Iniciais	RG Hosp	CC	idade	d/m/a	Sexo	Data Pedido	IP	CT	AK	PTc	GA	TZ	PM	PM/PML
10480	<i>E. cloacae</i>	H.A.G.	10042064	1470	49	a	M	30/1/2003	0,38	256,10	256,10	256,10	32,10	256,10	256,10	Não ESBL
10543	<i>E. cloacae</i>	W.P.S	10047116	1671	8	d	M	5/2/2003	0,50	0,38	3,00	3,00	0,03	0,38	0,13	0
10610	<i>E. cloacae</i>	V.B.S	1561134	1199	5	m	F	12/2/2003	3,00	0,19	2,00	3,00	0,02	0,25	0,06	0
10739	<i>E. aerogenes</i>	J.V.P	7627	8294	6	m	M	22/2/2003	1,00	256,10	48,00	32,00	0,25	32,00	32,00	ESBL
10831	<i>E. cloacae</i>	D.S	10041252	1570	74	a	M	2/3/2003	0,50	256,10	24,00	256,10	8,00	64,00	256,10	Não ESBL
10832	<i>E. cloacae</i>	G.L.J	10099090	1700	13	a	F	26/2/2003	0,50	3,00	3,00	3,00	0,03	0,25	0,06	0
10833	<i>E. cloacae</i>	J.S	10039489	1570	34	a	M	28/2/2003	0,50	256,10	16,00	64,00	6,00	64,00	192,00	Não ESBL
10834	<i>E. cloacae</i>	A.G.A	1532812	1199	6	m	M	20/2/2003	0,50	0,25	2,00	2,00	0,03	0,38	0,05	0
10844	<i>E. cloacae</i>	M.S.S	10014065	1218	37	a	F	24/02/2003	0,38	48	24	16	8	24	1,5	0
10922	<i>E. cloacae</i>	S.C.R	10050026	1431	48	a	F	13/3/2003	0,38	256,10	256,00	4,00	1,00	256,00	24,00	ESBL
10957	<i>E. cloacae</i>		10050197					18/3/2003	0,50	0,13	4,00	2,00	0,02	0,25	0,06	0
11040	<i>E. cloacae</i>	N.C.C	10040065	1690	7	m	M	29/5/2003	0,75	0,19	2,00	3,00	0,03	0,19	0,06	0
11139	<i>E. cloacae</i>	M.V.A.S	1128666	1199	2	a	M	5/6/2003	0,38	0,50	3,00	3,00	0,03	0,38	0,13	0
11190	<i>E. cloacae</i>	R.M.S	1128094	1218	2	a	F	9/6/2003	0,75	0,25	2,00	4,00	0,03	0,19	0,06	0
11191	<i>E. aerogenes</i>	P.M	546152	1710	43	a	M	8/6/2003	0,38	0,38	4,00	4,00	0,13	1,00	0,13	0
11228	<i>E. cloacae</i>	M.Y.P.F	10050364	1199	8	m	M	14/6/2003	0,38	256,10	3,00	3,00	0,19	0,38	0,50	0
11233	<i>E. cloacae</i>	B.R.F	1102478	1685	2	a	F	11/6/2003	0,75	0,19	3,00	4,00	0,03	0,38	0,09	0
11234	<i>E. aerogenes</i>	C.A.F	228475	1580	74	a	M	13/6/2003	0,75	48,00	3,00	4,00	0,06	256,00	1,00	0
11235	<i>E. cloacae</i>	C.J.F	10055275	1430	44	a	M	12/6/2003	0,38	256,10	256,10	256,00	32,10	48,00	192,00	ESBL
11294	<i>E. cloacae</i>	T.T.A.R	629768	1700	15	a	F	18/6/2003	0,38	2,00	3,00	3,00	0,03	3,00	0,09	0
11297	<i>E. cloacae</i>	M.C.Q	10051898	1780	40	a	F	17/6/2003	1,50	256,10	96,00	256,10	32,10	256,10	16,00	Não ESBL
11334	<i>E. cloacae</i>	N.O.P	10058102	1490	33	a	M	23/6/2003	0,75	256,10	96,00	256,10	32,10	256,10	256,00	Não ESBL
11599	<i>E. cloacae</i>	N.V.S	7997	8294	1	a	F	18/7/2003	0,38	0,25	3,00	3,00	0,05	8,00	0,75	0
12035	<i>E. cloacae</i>	J.M	10065058	1430	65	a	M	2/9/2003	1,50	256,10	6,00	256,10	32,10	256,10	256,00	Não ESBL
12137	<i>E. cloacae</i>	A.F.D	10063656	1570	63	a	M	16/9/2003	0,25	48,00	3,00	0,75	0,02	256,00	0,03	0
12149	<i>E. aerogenes</i>	A.R	10053501	1710	69	a	F	20/9/2003	0,50	0,19	3,00	4,00	0,03	0,38	0,09	0
12152	<i>E. cloacae</i>	J.C	10065372	1580	55	a	M	18/9/2003	0,75	0,25	3,00	3,00	0,03	0,04	0,09	0
12306	<i>E. hormaechei</i>	F.A.F	10017874	1218	68	a	M	9/10/2003	0,75	0,25	3,00	3,00	0,05	0,38	0,09	0

Banco	Espécie	Iniciais	RG Hosp	CC	idade	d/m/a	Sexo	Data Pedido	IP	CT	AK	PTc	GA	TZ	PM	PM/PML
12316	E. cloacae	T.C.A	10064545	1199	7	m	F	11/10/2003	0,38	0,09	3,00	3,00	0,05	0,25	0,06	0
12320	E. cloacae	R.C.S	7904	8294	10	m	M	11/10/2003	0,25	0,13	3,00	2,00	0,05	0,13	0,09	0
12370	E. cloacae	G.P.S	10018992	1700	8	a	M	16/10/2003	0,38	0,09	3,00	3,00	0,03	0,38	0,09	0
12372	E. cloacae	J.F.D	1032256	1199	5	a	F	15/10/2003	0,38	2,00	3,00	3,00	0,05	0,25	0,09	0
12388	E. cloacae	I.J.S	9258898	1199	8	a	F	17/10/2003	0,38	0,09	3,00	4,00	0,03	0,25	0,09	0
12410	E. cloacae	RN.G.C.S	10069313	1670	12	d	F	21/10/2003	0,50	0,13	3,00	1,50	0,02	0,13	0,05	0
12432	E. cloacae	V.J.S	10070017	1500	61	a	M	24/10/2003	0,50	0,38	4,00	3,00	0,03	0,04	0,09	0
12492	E. cloacae	M.B	444495	1219	71	a	M	31/10/2003	0,38	256,10	48,00	256,10	16,00	256,10	8,00	Não ESBL
12498	E. cloacae	L.F.B.B	10054208	1199	8	m	M	31/10/2003	0,38	0,13	3,00	4,00	0,03	0,75	0,09	0
12832	E. cloacae	C.D.S.S	10020184	2308	3	a	M	1/12/2003	0,38	0,13	2,00	3,00	0,03	0,19	0,06	0
13020	E. cloacae	M.F.S	10073872	1510	20	a	F	10/1/2004	0,38	1,00	3,00	3,00	0,02	0,50	0,25	0
13091	E. cloacae	G.S.S	10036828	1199	2	a	M	11/1/2004	0,25	0,13	2,00	3,00	0,02	0,25	0,06	0
13124	E. cloacae	M.P.S	10062315	1431	59	a	M	14/1/2004	0,50	0,19	2,00	4,00	0,02	96,00	0,09	0
13125	E. cloacae	J.R.A	10052177	1199	2	a	F	15/1/2004	0,38	256,10	2,00	256,10	0,02	256,10	32,00	ESBL
13161	E. cloacae	R.J.N.J	10047985	1199	1	a	M	19/1/2004	0,38	0,25	2,00	3,00	0,02	0,25	0,06	0
13293	E. cloacae	G.L.C	1723117	1199	22	d	M	29/1/2004	0,38	0,25	2,00	2,00	0,03	0,25	0,06	0
13397	E. cloacae	A.R.M	10046445	1199	1	a	F	6/2/2004	0,50	0,25	2,00	12,00	0,03	0,75	0,38	0
13409	E. aerogenes	M.L.M	10013893	1620	76	a	F	5/2/2004	0,25	0,25	3,00	3,00	0,06	0,25	0,13	0
13412	E. cloacae	Y.F.O	1155724	1199	2	a	F	7/2/2004	0,25	0,25	1,50	2,00	0,03	0,25	0,06	0
13435	E. cloacae	J.C.F	10077450	1490	55	a	M	8/2/2004	0,50	0,38	2,00	2,00	0,03	0,25	0,06	0
13440	E. cloacae	C.D.P	10057202	1199	11	a	F	10/2/2004	1,00	0,19	2,00	4,00	0,03	0,25	0,06	0
13441	E. cloacae	J.B.L	10070412	1218	73	a	F	9/2/2004	0,38	32,00	1,50	1,50	0,03	3,00	0,06	0
13442	E. cloacae	P.I.R	1728424	1218	63	a	M	9/2/2004	0,25	0,25	2,00	24,00	0,03	0,19	0,06	0
13443	E. cloacae	D.G.L.R	10063305	1218	1	a	M	9/2/2004	0,38	32,00	3,00	3,00	0,03	24,00	0,05	0
13444	E. cloacae	J.V.S	1728427	1218	25	d	M	9/2/2004	0,38	0,19	3,00	3,00	0,03	0,25	0,09	0
13498	E. cloacae	M.M.L	1729818	1223	76	a	F	11/2/2004	0,25	1,50	0,25	2,00	3,00	0,05	0,06	0
13499	E. cloacae	L.D.S	1557712	1199	9	a	M	12/2/2004	0,38	0,38	2,00	3,00	0,03	0,25	0,06	0
13501	E. cloacae	W.G	1004507	1431	76	a	M	13/2/2004	0,38	256,10	12,00	256,10	32,10	256,10	256,10	Não ESBL
13548	E. cloacae	M.J.L.C	10022510	1199	9	a	F	14/2/2004	0,25	32,00	6,00	3,00	0,03	0,25	1,50	0
13549	E. amnigenus b. 2	R.P.S	10075264	1750	44	a	F	15/2/2004	0,38	32,00	192,00	4,00	1,00	256,10	2,00	ESBL
13550	E. cloacae	R.P.S	10015240	1430	60	a	M	13/2/2004	1,00	32,00	24,00	256,10	32,00	256,10	256,10	Não ESBL
13566	E. cloacae	I.P.S	10075959	1218	3	a	F	17/2/2004	0,38	0,19	3,00	3,00	0,03	0,25	0,05	0
13570	E. cloacae	T.C.S.S	1727741	1199	1	m	F	16/2/2004	0,38	0,13	1,50	2,00	0,03	0,25	0,06	0
13611	E. cloacae	A.A.O	10046017	1680	3	a	F	18/2/2004	0,38	0,19	2,00	2,00	0,03	0,19	0,09	0

Banco	Espécie	Iniciais	RG Hosp	CC	idade	d/m/a	Sexo	Data Pedido	IP	CT	AK	PTc	GA	TZ	PM	PM/PML
13618	E. cloacae	A.F.O	1737492	1199	2	a	F	19/2/2004	0,38	0,19	2,00	2,00	0,03	0,38	0,09	0
13630	E. cloacae	RN.L.M.S	10079392	1671	3	d	F	21/2/2004	0,38	0,19	2,00	2,00	0,03	0,25	0,25	0
13685	E. cloacae	G.S.R	10051268	1199	11	m	M	25/2/2004	0,38	0,19	2,00	3,00	0,06	0,25	0,06	0
13702	E. cloacae	L.A.T	10026212	1219	46	a	M	25/2/2004	0,38	32,00	12,00	96,00	0,38	256,10	1,00	0
13753	E. cloacae	M.M.M	885097	1218	83	a	F	2/3/2004	0,38	32,00	2,00	2,00	0,02	48,00	0,06	0
13754	E. cloacae	W.S	1109128	1199	4	a	M	3/3/2004	0,38	0,25	2,00	2,00	0,05	0,19	0,09	0
13790	E. cloacae	G.N.N	10069207	1725	26	a	M	4/3/2004	0,38	32,00	2,00	1,50	0,03	0,19	0,06	0
13830	E. cloacae	G.S.S	10078316	1700	1	m	M	6/3/2004	1,50	1,50	2,00	3,00	0,05	0,25	0,06	0
13923	E. cloacae	H.H.N	10054092	1580	40	a	M	14/3/2004	0,25	0,25	2,00	2,00	0,03	0,50	0,06	0
13924	E. cloacae	M.S	10072115	1685	4	m	M	13/3/2004	0,50	32,00	3,00	1,50	0,02	48,00	0,03	0
13984	E. cloacae	C.C	10088866	1460	40	a	F	16/3/2004	0,25	32,00	2,00	6,00	0,02	24,00	0,50	0
14008	E. cloacae	V.A.S	80778401	1580	27	a	F	16/3/2004	2,00	32,00	32,00	256,10	32,10	256,10	256,10	Não ESBL
20015	E. cloacae	C.O.S	10023277	1779	19	a	F	28/3/2003	0,38	4,00	3,00	256,10	0,03	1,00	0,19	0
20027	E. cloacae	RN.E.S	10101010	1670	1	d		28/3/2003	0,38	0,09	2,00	2,00	0,02	0,19	0,06	0
20042	E. cloacae	RN.C.B.S	10051538	1670	4	d		30/3/2003	0,50	0,25	2,00	3,00	0,32	0,38	0,13	0
20059	E. cloacae	A.N.S	10047551	1685	3	m	M	31/3/2003	0,38	0,13	3,00	2,00	0,02	0,19	0,05	0
20096	E. cloacae	D.A.G	1017631	1780	77	a	F	1/4/2003	0,75	256,10	48,00	256,10	32,10	256,10	16,00	Não ESBL
20097	E. cloacae	N.C.S	1043707	1199	11	a	F	2/4/2003	0,75	3,00	3,00	3,00	0,05	2,00	0,06	0
20120	E. cloacae	B.A.D	1588657	1199	6	a	F	7/4/2003	0,38	0,38	2,00	2,00	0,03	0,38	0,09	0
20174	E. cloacae	T.S.R	10052468	1680	1	m	F	10/4/2003	0,38	0,25	3,00	3,00	0,03	0,50	0,06	0
20222	E. cloacae	L.C.S	5086	8294	3	a	M	17/4/2003	0,75	0,38	2,00	2,00	0,02	0,38	0,19	0
20251	E. cloacae	J.A.S	10042507	1720	14	a	M	17/4/2003	0,75	1,00	3,00	3,00	0,03	0,38	0,13	0
20289	E. cloacae	I.D.T.C	10054256	1685	2	m	M	26/4/2003	0,75	0,25	3,00	3,00	0,05	0,38	0,13	0
20333	E. aerogenes	J.M.C.P	1600926	1640	88	a	M	4/5/2003	0,75	0,19	2,00	3,00	0,19	0,25	0,09	0
20353	E. aerogenes	J.M.C.P	1600920	1660	24	a	M	3/5/2003	0,38	0,19	2,00	4,00	0,06	0,25	0,09	0
20393	E. cloacae	T.D.S	1068927	1199	6	a	F	9/5/2003	0,50	0,25	3,00	3,00	0,03	0,50	0,09	0
20465	E. cloacae	R.S.J	10038015	1680	7	a	M	12/5/2003	0,50	0,19	2,00	3,00	0,03	0,25	0,09	0
20540	E. cloacae	E.M.P	1226169	1199	2	a		22/5/2003	0,50	0,13	3,00	3,00	0,03	0,19	0,06	0
20541	E. cloacae	M.F.F.J	1131444	1199	2	a		19/5/2003	0,38	32,00	3,00	3,00	0,02	256,10	0,06	0
20542	E. cloacae	J.B.R	1601037	1199	50	a		20/5/2003	0,38	0,25	3,00	4,00	0,03	0,38	0,09	0
20565	E. cloacae							24/5/2003	0,50	0,09	3,00	3,00	0,03	0,19	0,05	0

Siglas: cc, centro de custo (unidade); d, dia; m, mês; a, ano; IP, imipenem; CT, cefotaxima; AK, amicacina; Ptc, piperacilina/ tazobactam; GA, gatifloxacina; TZ, ceftazidima; PM, cefepima; PM/PML, cefepima/ cefepima + Ácido clavulânico (teste fenotípico para ESBL).

Anexo 2. Perfil de sensibilidade, resultado do teste fenotípico para ESBL e ribotipo dos isolados de *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida à cefepima.

N. Pcte	Banco	Iniciais	RG Hosp	Espécie	Imp.	Cefotax.	Amica	Pipetazo	Gati	Ceftaz	Cefepima	Fenótipo	Ribogrupo
1	10831	D.S	10041252	<i>E. cloacae</i>	0,5	256,1	24	256,1	8	64	256,1	Não ESBL	150-2
2	10480	H.A.G.	10042064	<i>E. cloacae</i>	0,38	256,1	256,1	256,1	32,1	256,1	256,1	Não ESBL	150-1
3	13501	W.G	1004507	<i>E. cloacae</i>	0,38	256,1	12	256,1	32,1	256,1	256,1	Não ESBL	150-1
4	13550	R.P.S	10015240	<i>E. cloacae</i>	1	32	24	256,1	32	256,1	256,1	Não ESBL	150-1
5	14008	V.A.S	80778401	<i>E. cloacae</i>	2	32	32	256,1	32,1	256,1	256,1	Não ESBL	150-1
6	11334	N.O.P	10058102	<i>E. cloacae</i>	0,75	256,1	96	256,1	32,1	256,1	256	Não ESBL	150-8
7	12035	J.M	10065058	<i>E. cloacae</i>	1,5	256,1	6	256,1	32,1	256,1	256	Não ESBL	150-8
8	10833	J.S	10039489	<i>E. cloacae</i>	0,5	256,1	16	64	6	64	192	Não ESBL	150-2
9	11235	C.J.F	10055275	<i>E. cloacae</i>	0,38	256,1	256,1	256	32,1	48	192	ESBL	150-1
10	10739	J.V.P	7627	<i>E. aerogenes</i>	1	256,1	48	32	0,25	32	32	ESBL	153-7
11	13125	J.R.A	10052177	<i>E. cloacae</i>	0,38	256,1	2	256,1	0,02	256,1	32	ESBL	153-2
12	10922	S.C.R	10050026	<i>E. cloacae</i>	0,38	256,1	256	4	1	256	24	ESBL	150--4
13	11297	M.C.Q	10051898	<i>E. cloacae</i>	1,5	256,1	96	256,1	32,1	256,1	16	Não ESBL	150-7
14	20096	D.A.G	1017631	<i>E. cloacae</i>	0,75	256,1	48	256,1	32,1	256,1	16	Não ESBL	150-1
15	12492	M.B	444495	<i>E. cloacae</i>	0,38	256,1	48	256,1	16	256,1	8	Não ESBL	
16	13549	R.P.S	10075264	<i>E. amnigenus</i>	0,38	32	192	4	1	256,1	2	ESBL	

* As concentrações dentro dos quadros amarelos representam isolados sensíveis aos antimicrobianos correspondentes. Abreviaturas: Imp, imipenem; Cefotax, cefotaxima; Amica, amicacina; Gati, gatifloxacina; Ceftaz, ceftazidima.

Anexo 3. Quadro com dados clínicos dos pacientes com bacteremia por *Enterobacter* spp. com sensibilidade reduzida à cefepima.

Nº Pcte	Banco Microrg.	Iniciais	Idade	Sexo	Doença base, diagnóstico infeccioso	Unidade internação	Infecção Nosocomial/ Comunitária	Bacteremia (fonte)	ATB prévio	Óbito
1	10831	D.S.	74	M	TU bexiga	UTI geral	Nosocomial	1 ^a	CRO	X
2	10480	H.A.G.	49	M	Tx fígado, Ascite	Gastrocirurgia	Nosocomial	2 ^a	CRO	
3	13501	W.G.	76	M	Ulcer.gast, BCP	UTI geral	Nosocomial	1 ^a	CRO	X
4	13550	R.P.S.	60	M	ICC + LMA	UTI geral	Nosocomial	1 ^a	IMP	X
5	14008	V.A.S.	27	F		Neurocirurgia				
6	11334	N.O.P.	33	M	Tx cardíaco	Cirurgia cardíaca	Nosocomial	2 ^a (pulmão)	IMP	
7	12035	J.M.	65	M	BCP	UTI geral	Nosocomial	2 ^a (pulmão)	CRO	X
8	10833	J.S.	34	M	Tuberculose pulmonar	UTI geral	Nosocomial	2 ^a (pulmão)	vanco	X
9	11235	C.J.S.	44	M	HDA + PNM aspirativa	UTI geral	Nosocomial	1 ^a	CRO, CAZ, FEP	
10	10739	J.V.P.	6 m	M	Tumor renal	IOP	Comunitária	1 ^a	FEP, AK	
11	13125	J.R.A.	2	F	Hematoma subdural, PNM	Pediatria	Comunitária	2 ^a (pulmão)	-	
12	10922	S.C.R.	48	F	BCP	UTI geral	Comunitária	2 ^a (pulmão)	-	
13	11297	M.C.Q.	40	F	LMA	Enfermaria 11 andar	Nosocomial	1 ^a	FEP, SUL/TRIM	
14	20096	D.A.G.	77	F	Carcinoma peritoneal	Enfermaria 11 andar	Nosocomial	1 ^a	-	
15*	12492	M.B.	71	M	IRC, infecção pé diabético	Cirurgia	Nosocomial	1 ^a	Vanco, CIP	X
16*	13549	R.P.S.	44	F	LMA	Hematologia	Nosocomial	1 ^a	FEP, CAZ, AK	X

8 – REFERÊNCIAS

Aibinu IE, Ohaegbulam VC, Adenipekun EA, Ogunsola FT, Odugbemi TO, Mee BJ. Extended-spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of *Enterobacter* species from Lagos, Nigeria. J Clin Microbiol 2003; 41(5):2197-2200.

Aksaray S, Dokuzoguz B, Guvener E, Yucesoy M, Yulug N, Kocagoz S et al. Surveillance of antimicrobial resistance among gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. J Antimicrob Chemother 2000; 45(5):695-699.

Alekshun MN, Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(10):2067-2075.

Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(2):533-537.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980; 289(1036):321-331.

Antaniadou A, Giamarellou H, Avlami A, Sarmi E. Restriction policy and strict monitoring of quinolone usage may decrease resistance in the hospital. American Society for Microbiology , 115. 1997.

Ref Type: Abstract

Arpin C, Dubois V, Coulange L, Andre C, Fischer I, Noury P et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(11):3506-3514.

Babini GS, Livermore DM. Effect of conalbumin on the activity of Syn 2190, a 1,5 dihydroxy-4-pyridon monobactam inhibitor of AmpC beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45(1):105-109.

Ballow CH, Schentag JJ. Trends in antibiotic utilization and bacterial resistance. Report of the National Nosocomial Resistance Surveillance Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15(2 Suppl):37S-42S.

Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* 2000; 182(12):3467-3474.

Barnaud G, Benzerara Y, Gravisse J, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Labia R et al. Selection during cefepime treatment of a new cephalosporinase variant with extended-spectrum resistance to cefepime in an *Enterobacter aerogenes* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(3):1040-1042.

Barnaud G, Labia R, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Philippon A, Arlet G. Extension of resistance to cefepime and ceftazidime associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 195(2):185-190.

Bartowsky E, Normark S. Interactions of wild-type and mutant AmpR of *Citrobacter freundii* with target DNA. *Mol Microbiol* 1993; 10(3):555-565.

Bates DW, Goldman L, Lee TH. Contaminant blood cultures and resource utilization. The true consequences of false-positive results. *JAMA* 1991; 265(3):365-369.

Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 1992; 20(3):158-163.

Bell JM, Turnidge JD, Jones RN. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pacific region: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(12):3989-3993.

Blot S, Vandewoude K, De Bacquer D, Colardyn F. Nosocomial bacteremia caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria in critically ill patients: clinical outcome and length of hospitalization. *Clin Infect Dis* 2002; 34(12):1600-1606.

Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(7):1936-1942.

Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(8):2269-2275.

Bornet C, Saint N, Fetnaci L, Dupont M, Davin-Regli A, Bollet C et al. Omp35, a new *Enterobacter aerogenes* porin involved in selective susceptibility to cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(6):2153-2158.

Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, Pages JM, Bollet C. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3):1048-1052.

Bornet C, Chollet R, Mallea M, Chevalier J, Davin-Regli A, Pages JM et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301(4):985-990.

Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3):563-569.

Bredin J, Saint N, Mallea M, D E, Molle G, Pages JM et al. Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region. *Biochem J* 2002; 363(Pt 3):521-528.

Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32(7):1085-1089.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6):1211-1233.

Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998; 27 Suppl 1:S48-S53.

Bush K, Singer SB. Biochemical characteristics of extend broad spectrum beta-lactamases. *Infection* 1989; 17:429-433.

Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, 2b', 2c, 2d, 2e, 3 e 4. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:264-276.

Calil R, Marba ST, von Nowakowski A, Tresoldi AT. Reduction in colonization and nosocomial infection by multiresistant bacteria in a neonatal unit after institution of educational measures and restriction in the use of cephalosporins. *Am J Infect Control* 2001; 29(3):133-138.

Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela MC, Perez-Diaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4):1237-1243.

Carmo JRF. Correlação epidemiológica, microbiológica e clínica das infecções hospitalares em unidades de terapia intensiva causadas por *Klebsiella pneumoniae*. Universidade Federal de São Paulo, 2003.

Casellas JM, Blanco MG, Pinto ME. The sleeping giant. Antimicrobial resistance. *Infect Dis Clin North Am* 1994; 8:29-45.

Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(3):630-637.

Charrel RN, Pages JM, De Micco P, Mallea M. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(12):2854-2858.

Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol* 1995; 43(4):300-309.

Cheng Y, Chen M. Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter gergoviae* and *Escherichia coli* in China. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(12):2838-2842.

Chollet R, Chevalier J, Bollet C, Pages JM, Davin-Regli A. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(7):2518-2523.

Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP et al. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* 1991; 115(8):585-590.

Collin BA, Leather HL, Wingard JR, Ramphal R. Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin Infect Dis* 2001; 33(7):947-953.

Cosgrove SE, Kaye KS, Eliopoulous GM, Carmeli Y. Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Arch Intern Med* 2002; 162(2):185-190.

Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2003;

De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. The French Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(11):3177-3179.

De Champs C, Sirot D, Chanal C, Poupart MC, Dumas MP, Sirot J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum beta-lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a French hospital. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27(4):441-457.

De Champs C, Henquell C, Guelon D, Sirot D, Gazuy N, Sirot J. Clinical and bacteriological study of nosocomial infections due to *Enterobacter aerogenes* resistant to imipenem. *J Clin Microbiol* 1993; 31(1):123-127.

De Gheldre Y, Maes N, Rost F, De Ryck R, Clevenbergh P, Vincent JL et al. Molecular epidemiology of an outbreak of multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* infections and in vivo emergence of imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 1997; 35(1):152-160.

Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B. The signal molecule for beta-lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(10):2113-2120.

Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, del Carmen CM, Pascual A, Tomas JM et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(10):3332-3335.

Doucet-Populaire F, Ghnassia JC, Bonnet R, Sirot J. First isolation of a CTX-M-3-producing *Enterobacter cloacae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(11):3239-3240.

Dutzler R, Rummel G, Alberti S, Hernandez-Alles S, Phale P, Rosenbusch J et al. Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure Fold Des* 1999; 7(4):425-434.

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999; 29(2):239-244.

Ehrhardt AF, Sanders CC, Thomson KS, Watanakunakorn C, Trujillano-Martin I. Emergence of resistance to imipenem in *Enterobacter* isolates masquerading as *Klebsiella pneumoniae* during therapy with imipenem/cilastatin. *Clin Infect Dis* 1993; 17(1):120-122.

Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol* 1997; 35(8):2061-2067.

Farias W, Sader H, Leme I, Pignatari A. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. *Ass Med Brasil* 1997; 43(3):199-204.

Fluit AC, Verhoef J, Schmitz FJ. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(9):617-625.

Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis* 2000; 30(3):454-460.

Fung-Tomc JC, Gradelski E, Huczko E, Dougherty TJ, Kessler RE, Bonner DP. Differences in the resistant variants of *Enterobacter cloacae* selected by extended-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(5):1289-1293.

Gales AC, Bolmström A, Sampaio J, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases (ESBL) isolated in hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis* 1997; 4:196-203.

Gallagher PG. *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. *Rev Infect Dis* 1990; 12(5):808-812.

Gambino L, Gracheck SJ, Miller PF. Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993; 175(10):2888-2894.

Garau J. Beta-lactamases: current situation and clinical importance. *Intensive Care Med* 1994; 20 Suppl 3:S5-S9.

Gayet S, Chollet R, Molle G, Pages JM, Chevalier J. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(5):1555-1559.

George AM. Multidrug resistance in enteric and other gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 139(1):1-10.

Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial *Enterobacter* isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1):175-182.

Goldstein FW, Pean Y, Rosato A, Gertner J, Gutmann L. Characterization of ceftriaxone-resistant *Enterobacteriaceae*: a multicentre study in 26 French hospitals. *Vigil'Roc Study Group. J Antimicrob Chemother* 1993; 32(4):595-603.

Gottlieb T, Wolfson C. Comparison of the MICs of cefepime for extended-spectrum beta-lactamase-producing and non-extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Enterobacter cloacae*. J Antimicrob Chemother 2000; 46(2):330-331.

Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. JAMA 1999; 281(1):67-71.

Hancock RE, Bellido F. Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1992; 29 Suppl A:1-6.

Harbarth S, Sudre P, Dharan S, Cadenas M, Pittet D. Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20(9):598-603.

Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon WR, Gilman AG. Quimioterapia das doenças microbianas. In: McGraw-Hill, editor. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 2000: 757-876.

Hermans PE, Washington JA. Polymicrobial bacteremia. Ann Intern Med 1970; 73(3):387-392.

Hibbert-Rogers LC, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM, Todd N, Lewis IJ et al. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. J Antimicrob Chemother 1995; 36(1):65-82.

Hidalgo SR. Análise do perfil de consumo de antimicrobianos em um hospital de ensino. Universidade Federal de São Paulo, 2003.

Hollis RJ, Bruce JL, Fritschel SJ, Pfaller MA. Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34(4):263-268.

<http://www.lahey.org/studies/web.asp>- acesso em março de 2005.

Huang H, Hancock RE. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1996; 178(11):3085-3090.

Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118(1):146-155.

Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) Surveillance Report, data summary from January 1996 through December 1997: A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *Am J Infect Control* 1999; 27(3):279-284.

Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J* 1994; 13(19):4684-4694.

Jacobs C, Joris B, Jamin M, Klarsov K, Van Beeumen J, Mengin-Lecreulx D et al. AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol Microbiol* 1995; 15(3):553-559.

Jacobson KL, Cohen SH, Inciardi JF, King JH, Lippert WE, Iglesias T et al. The relationship between antecedent antibiotic use and resistance to extended-spectrum cephalosporins in group I beta-lactamase-producing organisms. *Clin Infect Dis* 1995; 21(5):1107-1113.

Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(9):1697-1704.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10(4):867-878.

Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29 Suppl A:19-24.

Jones RN, Pfaller MA, Doern GV, Erwin ME, Hollis RJ. Antimicrobial activity and spectrum investigation of eight broad-spectrum beta-lactam drugs: a 1997 surveillance trial in 102 medical centers in the United States. Cefepime Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30(3):215-228.

Jones RN. Important and emerging beta-lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the Amp C enzymes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31(3):461-466.

Jones RN, Biedenbach DJ, Gales AC. Sustained activity and spectrum of selected extended-spectrum beta-lactams (carbapenems and cefepime) against *Enterobacter* spp. and ESBL-producing *Klebsiella* spp.: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (USA, 1997-2000). *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21(1):1-7.

Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(2):760-766.

Kartali G, Tzelepi E, Pournaras S, Kontopoulou C, Kontos F, Sofianou D et al. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated beta-lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(5):1577-1580.

Kaye KS, Cosgrove S, Harris A, Eliopoulos GM, Carmeli Y. Risk factors for emergence of resistance to broad-spectrum cephalosporins among *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(9):2628-2630.

Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 2000; 37(2):239-253.

Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000; 31 Suppl 4:S131-S138.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Enterobacteriaceae*. *Texto e Atlas Colorido*. 2001: 177-250.

Korfmann G, Sanders CC. ampG is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(11):1946-1951.

Kuga A, Okamoto R, Inoue M. ampR gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3):561-567.

Lee SO, Kim YS, Kim BN, Kim MN, Woo JH, Ryu J. Impact of previous use of antibiotics on development of resistance to extended-spectrum cephalosporins in patients with *Enterobacter* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(8):577-581.

Levison ME, Mailapur YV, Pradhan SK, Jacoby GA, Adams P, Emery CL et al. Regional occurrence of plasmid-mediated SHV-7, an extended-spectrum beta-lactamase, in *Enterobacter cloacae* in Philadelphia Teaching Hospitals. *Clin Infect Dis* 2002; 35(12):1551-1554.

Leying H, Cullmann W, Dick W. Carbapenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is due to lipopolysaccharide alterations. *Chemotherapy* 1991; 37(2):106-113.

Lindberg F, Normark S. Common mechanism of ampC beta-lactamase induction in *Enterobacteria*: regulation of the cloned *Enterobacter cloacae* P99 beta-lactamase gene. *J Bacteriol* 1987; 169(2):758-763.

Linde HJ, Notka F, Irtenkauf C, Decker J, Wild J, Niller HH et al. Increase in MICs of ciprofloxacin in vivo in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(4):625-630.

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

Livermore DM. Determinants of the activity of beta-lactamase inhibitor combinations. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31 Suppl A:9-21.

Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):557-584.

aminoglycoside modifying enzymes, in 20 UK centres. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22(6):823-839.

Maki DG, Rhame FS, Mackel DC, Bennett JV. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products. I. Epidemiologic and clinical features. *Am J Med* 1976; 60(4):471-485.

Mallea M, Chevalier J, Bornet C, Eyraud A, Davin-Regli A, Bollet C et al. Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology* 1998; 144 (Pt 11):3003-3009.

Maneewannakul K, Levy SB. Identification for mar mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(7):1695-1698.

Mariotte S, Nordmann P, Nicolas MH. Extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 33:925-935.

Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(2):342-348.

Matsumoto Y, Inoue M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(2):307-313.

Mc Cabe, Jackson. Gram-negative bacteremia-clinical, laboratory and therapeutic observations. *Arch Intern Med* 1962; 110:92-100.

McGowan JE, Jr. Gram-positive bacteria: spread and antimicrobial resistance in university and community hospitals in the USA. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21 Suppl C:49-55.

Mendes C, Hsiung A, Kiffer C, Oplustil C, Sinto S, Mimica I et al. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2000; 4(5):236-244.

Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D et al. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis* 1997; 24 Suppl 1:S46-S62.

Mitsubishi S, Inoue M. [Mechanism of bacterial drug resistance]. *Nippon Rinsho* 1981; 39(1):18-25.

Moland ES, Black JA, Ourada J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of newer beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12):3837-3842.

Morosini MI, Negri MC, Shoichet B, Baquero MR, Baquero F, Blazquez J. An extended-spectrum AmpC-type beta-lactamase obtained by in vitro antibiotic selection. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 165(1):85-90.

Muller A, Lopez-Lozano JM, Bertrand X, Talon D. Relationship between ceftriaxone use and resistance to third-generation cephalosporins among clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(1):173-177.

Mutnick AH, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial usage and resistance trend relationships from the MYSTIC Programme in North America (1999-2001). *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(2):290-296.

Muytjens HL, van der Ros-van de Repe. Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29(2):367-370.

Naas T, Massuard S, Garnier F, Nordmann P. AmpD is required for regulation of expression of NmcA, a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(10):2908-2915.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *Am J Infect Control* 1996; 24(5):380-388.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999; 27(6):520-532.

NCCLS. "National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically." National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne. Approved Standart M100-S13. (2004).

Negri MC, Baquero F. In vitro selective concentrations of cefepime and ceftazidime for AmpC beta-lactamase hyperproducer *Enterobacter cloacae* variants. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4(10):585-588.

Neuwirth C, Siebor E, Lopez J, Pechinot A, Kazmierczak A. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1996; 34(1):76-79.

Nijssen S, Florijn A, Bonten MJ, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24(6):585-591.

Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(11):1831-1836.

Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 1994; 264(5157):382-388.

Nitzan Y, Deutsch EB, Pechatnikov I. Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Curr Microbiol* 2002; 45(6):446-455.

Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(5):939-946.

Normark S. beta-Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb Drug Resist* 1995; 1(2):111-114.

Park JT. Why does *Escherichia coli* recycle its cell wall peptides? *Mol Microbiol* 1995; 17(3):421-426.

Parr TR, Jr., Moore RA, Moore LV, Hancock RE. Role of porins in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31(1):121-123.

Pechere JC. Why are carbapenems active against *Enterobacter cloacae* resistant to third generation cephalosporins? *Scand J Infect Dis Suppl* 1991; 78:17-21.

Pereira AS, Carmo JRF, Tognim MCB, Sader HS. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39:301-308.

Peyret M, Albertini MT, Olleon M, Davenas C, Blanc V. [Detection of the phenotypes of resistance of *Enterobacteriaceae* to aminoglycosides with ATB Plus Expert System]. *Pathol Biol (Paris)* 1993; 41(4):329-336.

Pfaller MA. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123(11):1007-1010.

Pfaller MA, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of inducible AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme, Europe 1997-2000. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19(5):383-388.

Pfaller MA, Jones RN, Marshall SA, Coffman SL, Hollis RJ, Edmond MB et al. Inducible amp C beta-lactamase producing gram-negative bacilli from blood stream infections: frequency, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology in a national surveillance program (SCOPE). *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28(4):211-219.

Pfaller MA, Acar J, Jones RN, Verhoef J, Turnidge J, Sader HS. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. *Clin Infect Dis* 2000.

Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(8):1131-1136.

Piddock LJ, Traynor EA. beta-Lactamase expression and outer membrane protein changes in cefpirome-resistant and ceftazidime-resistant gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28(2):209-219.

Pitout JD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double-disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8):3933-3935.

Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Coudron P, Sanders CC. Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(3):596-600.

Pittet D. Nosocomial bloodstream infections. In: Wenzel RP, editor. *Prevention and control of nosocomial infections*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997: 711-769.

Pittet D, Tarara D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* 1994; 271(20):1598-1601.

Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3(2):117-127.

Preventing the Spread of Vancomycin Resistance--A Report from the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee prepared by the Subcommittee on Prevention and Control of Antimicrobial-Resistant Microorganisms in Hospitals; comment period and public meeting--CDC. *Notice. Fed Regist* 1994; 59(94):25758-25763.

Prevot MH, Andremont A, Sancho-Garnier H, Tancrede C. Epidemiology of intestinal colonization by members of the family *Enterobacteriaceae* resistant to cefotaxime in a hematology-oncology unit. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30(6):945-947.

Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr. et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(11):3035-3039.

Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(9):2080-2086.

Rhomberg PR, Jones RN, Sader HS. Results from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme: report of the 2001 data from 15 United States medical centres. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23(1):52-59.

Rice LB, Bonomo RA. beta -Lactamases: which ones are clinically important? *Drug Resist Updat* 2000; 3(3):178-189.

Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AA, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr. et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(11):2193-2199.

Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973; 9:31-88.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 2004; 8(1):25-79.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2001; 5(4):200-214.

Sader HS, Jones RN. [Cephalosporins: 4 generations of structural evolution]. *Rev Assoc Med Bras* 1995; 41(2):144-150.

Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med* 1995; 15(2):407-431.

Sader HS, Mimica I, Rossi F, Zoccoli C, Montelli AC, Sampaio JL et al. Evaluation of the in vitro activity of cefepime compared to other broad-spectrum cephalosporins against

clinical isolates from eighteen Brazilian hospitals by using the Etest. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28(2):87-92.

Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist* 1995; 1(3):195-202.

Sanders CC. beta-Lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992; 14(5):1089-1099.

Sanders CC, Bradford PA, Ehrhardt AF, Bush K, Young KD, Henderson TA et al. Penicillin-binding proteins and induction of AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(9):2013-2015.

Sanders CC, Ehrhardt AF, Moland ES, Thomson KS, Zimmer B, Roe DE. BetalasEN: microdilution panel for identifying beta-lactamases present in isolates of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1):123-127.

Sanders WE, Jr., Sanders CC. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(2):220-241.

Seifert H, Strate A, Schulze A, Pulverer G. Bacteremia due to *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *Infection* 1994; 22(6):379-385.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34(12):2909-2913.

Shannon K, Williams H, King A, Phillips I. Hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* serotype O15. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 55(3):319-323.

Sheng WH, Chen YC, Wang JT, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC. Emerging fluoroquinolone-resistance for common clinically important gram-negative bacteria in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43(2):141-147.

Silva J, Aguilar C, Becerra Z, Lopez-Antunano F, Garcia R. Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteria* in Mexico. *Microb Drug Resist* 1999; 5(3):189-193.

Stapleton P, Shannon K, Phillips I. DNA sequence differences of ampD mutants of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995a; 39(11):2494-2498.

Stapleton P, Shannon K, Phillips I. The ability of beta-lactam antibiotics to select mutants with derepressed beta-lactamase synthesis from *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 1995b; 36(3):483-496.

Stapleton PD, Shannon KP, French GL. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5):1206-1210.

Stearne LE, van Boxtel D, Lemmens N, Goessens WH, Mouton JW, Gyssens IC. Comparative study of the effects of ceftizoxime, piperacillin, and piperacillin-tazobactam concentrations on antibacterial activity and selection of antibiotic-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Bacteroides fragilis* in vitro and in vivo in mixed-infection abscesses. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(5):1688-1698.

Sturenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum beta-lactamases in an *Enterobacter*

- Talon D, Menget P, Thouverez M, Thiriez G, Gbaguidi HH, Fromentin C et al. Emergence of *Enterobacter cloacae* as a common pathogen in neonatal units: pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Hosp Infect* 2004; 57(2):119-125.
- Talon D, Bailly P, Bertrand X, Thouverez M, Mulin B. Clinical and molecular epidemiology of chromosome-mediated resistance to third-generation cephalosporins in *Enterobacter* isolates in eastern France. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(7):376-384.
- Thiolas A, Bornet C, Davin-Regli A, Pages JM, Bollet C. Resistance to imipenem, cefepime, and cefpirome associated with mutation in Omp36 osmoporin of *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317(3):851-856.
- Thomson KS, Sanders CC, Moland ES. Use of microdilution panels with and without beta-lactamase inhibitors as a phenotypic test for beta-lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(6):1393-1400.
- Thornsberry C, Brown SD, Yee YC, Bouchillon SK, Marler JK, Rich T. In-vitro activity of cefepime and other antimicrobials: survey of European isolates. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32 Suppl B:31-53.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50(5):673-679.
- Tresoldi AT, Padoveze MC, Trabasso P, Veiga JF, Marba ST, von Nowakonski A et al. *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. *Am J Infect Control* 2000; 28(3):258-261.
- Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2):542-546.

- Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Mentis AF, Vatopoulos AC, Tsakris A. Imipenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is associated with derepression of chromosomal cephalosporinases and impaired permeability. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 74(2-3):195-199.
- Vakulenko SB, Golemi D, Geryk B, Suvorov M, Knox JR, Mobashery S et al. Mutational replacement of Leu-293 in the class C *Enterobacter cloacae* P99 beta-lactamase confers increased MIC of cefepime. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6):1966-1970.
- van den Berg RW, Claahsen HL, Niessen M, Muytjens HL, Liem K, Voss A. *Enterobacter cloacae* outbreak in the NICU related to disinfected thermometers. *J Hosp Infect* 2000; 45(1):29-34.
- Varaldo PE, Biavasco F, Mannelli S, Pompei R, Proietti A. Distribution and antibiotic susceptibility of extraintestinal clinical isolates of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7(4):495-500.
- Varela C, Oliver A, Coque TM, Baquero F, Canton R. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in group-1 beta-lactamase-producing isolates. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(5):278-282.
- Vatopoulos AC, Kalapothaki V, Legakis NJ. Bacterial resistance to ciprofloxacin in Greece: results from the National Electronic Surveillance System. Greek Network for the Surveillance of Antimicrobial Resistance. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(3):471-476.
- Vatopoulos AC, Tsakris A, Tzouvelekis LS, Legakis NJ, Pitt TL, Miller GH et al. Diversity of aminoglycoside resistance in *Enterobacter cloacae* in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11(2):131-138.
- Velasco E, Byington R, Martins CS, Schirmer M, Dias LC, Goncalves VM. Bloodstream infection surveillance in a cancer centre: a prospective look at clinical microbiology aspects. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(6):542-549.

Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA 1995; 274(8):639-644.

Warren DK, Zack JE, Elward AM, Cox MJ, Fraser VJ. Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a non

Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(5):755-758.

Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(5):1343-1348.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4):1151-1161.

Yigit H, Anderson GJ, Biddle JW, Steward CD, Rasheed JK, Valera LL et al. Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12):3817-3822.

Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(6):1271-1272.

Abstract

Background: *Enterobacter* spp. is an important clinical pathogen in nosocomial bloodstream infections that frequently exhibits resistance to high spectrum cephalosporins. In this microorganism, resistance is usually due to derepression of AmpC locus, but other resistance mechanisms can also occur, like plasmid-encoded extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), which makes antimicrobial therapy options much more limited. **Purpose:** The main objectives of this study were to evaluate susceptibility profile, fourth-generation cephalosporin resistance, genetic similarity, and antimicrobial therapy adequacy among *Enterobacter* spp. isolated from bloodstream infections at Hospital São Paulo complex, in 2003 and 2004. **Methods:** A total of 93 bloodstream isolates consecutively collected between January 2003 and March 2004 were susceptibility tested for 7 broad-spectrum agents by using Etest and following the NCCLS procedures for agar diffusion tests. ESBL Etest strips for the detection of extended-spectrum beta-lactamases were used to determine ESBL phenotypes in *Enterobacter* spp. strains. The bloodstream cefepime-resistant *Enterobacter* spp. were further selected for molecular typing by automated ribotyping, and the medical records of all patients with positive blood culture for these cefepime resistant pathogens were examined to evaluate antimicrobial therapy adequacy and the effect of inappropriate empirical antibiotic therapy on patients outcome. **Results:** Resistance rates among *Enterobacter* spp. ranged from 28% for ceftazidime, 18,3% for cefotaxime and 12,9% for cefepime. Imipenem showed the highest susceptibility rate (100.0% susceptible) and was active even against the stably derepressed AmpC-producers. The overall rank order of spectrum (% susceptible) was: imipenem (100%) amikacin (86,0%) >cefepime (84,9%) = gatifloxacin (84,9%) >piperacillin/tazobactam (81,7%) >ceftazidime (72,0%) >cefotaxime (68,8%). Only 46,2% of ceftazidime-resistant *Enterobacter* spp. were susceptible to cefepime. Co-resistance to other antimicrobial agents was common among ceftazidime-resistant and cefepime-resistant isolates. Five strains of *Enterobacter* spp. were phenotypically detected as ESBL producers. Seven distinct ribotyping patterns were observed among the 14 cefepime-resistant *Enterobacter* spp.. Most of cefepime-resistant *Enterobacter* spp. bacteremias were from patients with severe comorbidities and admitted in intensive care units or surgical units. Of the 16 patients infected with cefepime-susceptibility-reduced *Enterobacter* spp., 5 received appropriate initial antimicrobial therapy. The mortality rate was higher in the inadequately treated group.

Conclusions: This study shows high rates of cefepime resistance in bloodstream *Enterobacter* spp. isolates due to the presence of additional mechanisms of antimicrobial resistance, other than ESBL production; and suggests that previous broad-spectrum cephalosporin administration could be related to resistance emergence, and empirical inappropriate antimicrobial therapy could adversely affect patients outcome. The great genomic variability found among cefepime-resistant *Enterobacter* spp. highlights the importance of appropriate use of antimicrobial agents, particularly broad-spectrum cephalosporins, to restrict selection of resistant isolates.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)