

**Valéria Cassettari Chiaratto**

**Fatores de risco para colonização de recém-nascidos durante surto  
de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro  
estendido em unidade neonatal de risco intermediário**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Medicina Preventiva.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Rossi Menezes

**São Paulo**

**2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Chiaratto, Valéria Cassettari

Fatores de risco para colonização de recém-nascidos durante surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido em unidade neonatal de risco intermediário / Valéria Cassettari Chiaratto. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Medicina Preventiva.

Área de concentração: Medicina Preventiva.

Orientador: Paulo Rossi Menezes.

Descritores: 1.*Klebsiella pneumoniae* 2.Beta-lactamases 3.Infecção hospitalar  
4.Recém-nascido 5.Fatores de risco

USP/FM/SBD-180/09

Dedico com carinho à memória dos meus queridos avós. Participaram deste trabalho a disposição da Ernestina, a seriedade do Augusto, a curiosidade da Alair, a paciência do Ernani, a dedicação da Açucena e a coragem do Luiz. A eles o meu agradecimento por tudo que me passaram de bom e espero que a homenagem esteja à altura!

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Rossi Menezes, pela atenção, crédito e estímulo desde o embrião deste trabalho.

À Enfa. Isa Rodrigues da Silveira Cabral de Menezes, pela colaboração na revisão dos prontuários. Aos demais colegas da CCIH/HU-USP, Dr. Fábio Franco e Enfa. Ana Cristina Balsamo, pela boa parceria e ambiente de aprendizado.

À equipe multiprofissional da unidade neonatal, pelo empenho na resolução do surto. Um agradecimento especial à profissional colonizada, que colaborou prontamente.

À Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez, Farm. Lilian Ferri Passadore, Farm. Stella Maria Guida, Farm. Silvia Regina dos Santos e Farm. Angélica Jean Balabakis, do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário, pelo suporte, incluindo a realização das culturas de rastreamento de *K. pneumoniae* ESBL e o armazenamento dos isolados.

Aos pesquisadores que realizaram a análise genética e microbiológica dos isolados: Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.), Prof. Dr. Nilton Lincopan (Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Departamento de Microbiologia), Milena Dropa, Profa. Maria Helena Matté e Prof. Glavur Rogério

Matté (Laboratório de Prática de Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública da USP).

Aos pareceristas do periódico *Journal of Hospital Infection*, cujos questionamentos resultaram na melhor compreensão e apresentação dos resultados.

### **Conflito de interesses**

Não há.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP.

### **Financiamento**

Este trabalho foi parcialmente financiado por CNPq, CECOVisa e FAPESP.

## Sumário

Resumo	
Summary	
1. Introdução .....	1
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	2
1.2. Tipagem molecular .....	4
1.3. Elementos genéticos móveis .....	5
1.4. Beta-lactamase de espectro estendido .....	6
1.5. Fatores de risco para colonização de neonatos por <i>K. pneumoniae</i> ESBL ....	10
2. Objetivo .....	13
3. Método. ....	14
3.1. Descrição do surto .....	17
3.2. Análise genética e microbiológica .....	19
3.3. Estudo de corte transversal .....	20
3.4. Análise estatística .....	21
3.5. Considerações éticas .....	22
4. Resultados .....	23
4.1. Estudo de corte transversal .....	23
4.2. Análise genética e microbiológica .....	28
5. Discussão .....	31
Referências .....	37
Anexo I: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa .....	45
Anexo II: Artigo publicado .....	47

## Resumo

Realizamos um estudo de corte transversal para investigar os fatores de risco para colonização de recém-nascidos por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido durante surto em unidade neonatal de risco intermediário. O surto se deveu à colonização crônica de profissional de saúde portadora de onicomicose.

Cento e vinte recém-nascidos internados na unidade neonatal durante um período de três meses foram rastreados para colonização por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL através de cultura de “swab” retal, sendo detectados 27 colonizados. A análise multivariada mostrou que a colonização se associou de forma independente ao uso prévio de antimicrobianos e à ausência de aleitamento materno. Os antimicrobianos mais utilizados foram penicilina e amicacina. Uso prévio de antimicrobianos apresentou odds ratio (OR) igual a 12,3 [intervalo de 95% de confiança (IC): 3,66-41,2,  $P < 0,001$ ]. Aleitamento materno foi associado à redução do risco de colonização (OR: 0,22; IC95%: 0,05-0,99;  $P = 0,049$ ).

Nove isolados recuperados no primeiro estágio do surto e 27 isolados de culturas de rastreamento foram posteriormente tipadas por eletroforese em gel de campo pulsado, revelando seis apresentações distintas (A a F). No primeiro estágio do surto ocorreram os clones A, C e E, enquanto entre os 27 isolados das culturas de rastreamento os seis clones foram identificados. O clone A também foi identificado nas mãos de técnica de enfermagem portadora de onicomicose.

Pudemos concluir que uso prévio de antimicrobianos predispôs à colonização. O possível efeito do aleitamento materno como fator protetor deve ser mais bem investigado. A detecção de diferentes genótipos de *K. pneumoniae* sugere que a

disseminação de elementos móveis portando o gene ESBL tenha se superposto à simples disseminação de um clone durante o surto.

Descritores: *Klebsiella pneumoniae*; Beta-lactamases; Infecção hospitalar; Recém-nascido; Fatores de risco.



## Summary

We describe a cross-sectional survey to identify risk factors for colonisation of neonates by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. This occurred following exposure to a colonised healthcare worker during an outbreak in an intermediate-risk neonatal unit.

In total, 120 neonates admitted consecutively during a three-month period were screened for ESBL-producing *K. pneumoniae* by rectal swabbing and 27 were identified as colonised. Multivariate analysis showed colonisation to be independently associated with use of antibiotics and absence of breastfeeding. Previous use of antibiotics presented an odds ratio (OR) of 12,3 [95% confidence interval (CI): 3,66-41,2,  $P < 0,001$ ]. The most commonly used antibiotics were penicillin and amikacin. Breastfeeding was associated with reduced risk for colonisation (OR: 0,22; 95% CI: 0,05-0,99;  $P = 0,049$ ).

Nine isolates recovered during the first stage of the outbreak and 27 isolates from surveillance cultures were typed thereafter by pulsed-field gel electrophoresis, revealing six different profiles (A - F). Clones A, C, and E were implicated in the first stage of the outbreak, whereas among the 27 strains recovered from surveillance cultures, all six clones were identified. Clone A was also found on the hand of a nursing auxiliary with onychomycosis.

We concluded that prior antimicrobial use predisposed to colonisation. The possible role of breastfeeding as a protective factor needs to be further elucidated. Detection of different genotypes of ESBL-producing *K. pneumoniae* suggests that

dissemination of mobile genetic elements bearing the ESBL gene may have been superimposed on the simple dissemination of a clone during the outbreak.

Descriptors: *Klebsiella pneumoniae*; Beta-lactamases; Cross infection; Infant, newborn; Risk factors.

## 1. Introdução

*Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (“Extended Spectrum Beta-Lactamase” - ESBL) é atualmente um patógeno de grande importância nas infecções hospitalares em todo o mundo (Sader et al., 2002; Hidron et al., 2008; Coque et al., 2008), ocorrendo de forma endêmica ou epidêmica. Grande número de surtos tem sido relatado, vários deles em unidades neonatais de cuidados intensivos, inclusive no Brasil (Martins-Loureiro et al., 2001; Otman et al., 2002; Pessoa-Silva et al., 2002; Boszczowski et al., 2005; Garcia et al., 2008).

O principal reservatório de *K. pneumoniae* ESBL é o trato intestinal dos indivíduos colonizados, e os profissionais de saúde participam como veículos de transmissão cruzada entre os pacientes. Por esse motivo, o controle de surtos por essa bactéria decorre frequentemente da somatória de múltiplas intervenções, principalmente a intensificação das medidas básicas de prevenção e o controle do uso de antimicrobianos. O uso de cefalosporinas de terceira geração já foi apontado como um dos determinantes na ocorrência de surtos, portanto a restrição do uso dessa classe de antimicrobianos é uma das medidas adotadas com maior frequência (Rahal et al., 1998; Patterson et al., 2000). Em um número mais restrito de relatos, o controle do surto se deu após identificação precisa de uma fonte comum de disseminação (Gaillot et al., 1998; Gupta et al., 2004; Boszczowski et al., 2005).

Como já foi referido, a grande maioria dos surtos em neonatos se desenvolveu em unidades de terapia intensiva (Martins-Loureiro et al., 2001; Otman et al., 2002; Pessoa-Silva et al., 2002; Gastmeier et al., 2003; Gupta et al., 2004; Bem-Hamouda et al., 2004; Boszczowski et al., 2005; Bagattini et al., 2006; Garcia et al., 2008). Os

recém-nascidos internados nessas unidades apresentam diversas características que podem aumentar o risco de aquisição de bactérias multirresistentes, como suas condições clínicas de base (prematuridade e baixo peso extremos, com comprometimento imune por motivos diversos), uso de várias classes de antimicrobianos por tempo prolongado, longo tempo de permanência hospitalar, grande exposição à manipulação pelos profissionais, exposição a diversos equipamentos e materiais reutilizáveis.

Os estudos em torno dos surtos em neonatos se detiveram principalmente nos fatores de risco associados à infecção, havendo menos informação disponível sobre o risco de colonização, que seria importante para orientar a prevenção de disseminação das cepas pelo hospital, de forma endêmica. No presente estudo tivemos a rara oportunidade de investigar e controlar um surto por *K. pneumoniae* ESBL relacionado a uma fonte comum de disseminação em uma unidade neonatal de risco intermediário, onde a presença de bactérias multirresistentes é incomum, e os pacientes internados são menos complexos em sua predisposição à colonização por essas bactérias. Assim, foi possível investigar fatores de risco para colonização pela bactéria em situação distinta do que vem sendo relatado em grande parte da literatura sobre o assunto.

### **1.1. *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* e está presente em indivíduos saudáveis, colonizando principalmente o trato intestinal (prevalência de 5 a 38%) e nasofaringe (1 a 6%)

(Podschun e Ullmann, 1998). Porém, pode também atuar como patógeno, causando infecções potencialmente graves, o que se deve à sua virulência e também à sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos.

O principal fator de virulência de *Klebsiella pneumoniae* é o polissacáride capsular, que apresenta mais de 70 variantes antigênicas. Acredita-se que o mecanismo de virulência do polissacáride seja a inibição da fagocitose. Contribui para a patogenicidade de *K. pneumoniae* sua grande variedade de fímbrias, que estão envolvidas nos mecanismos de adesão às células do hospedeiro (Podschun e Ullmann, 1998).

*K. pneumoniae* pode causar infecções comunitárias, como pneumonia ou infecção do trato urinário, porém atualmente sua importância como patógeno é bem maior nas infecções hospitalares (Podschun e Ullmann, 1998). Em seu primeiro relato global sobre resistência bacteriana, o National Healthcare Safety Network (NHSN) apontou *K. pneumoniae* como a sétima espécie bacteriana mais frequente nas infecções hospitalares no Estados Unidos, sendo identificada em 5,8% dos casos com agente conhecido (Hidron et al., 2008). Nesse mesmo relato, 21-27% das *K. pneumoniae* identificadas nas infecções associadas a dispositivos invasivos eram produtoras de ESBL.

Na América Latina, o estudo mais abrangente disponível é o que analisou as hemoculturas referentes a infecções hospitalares de centros de 9 cidades de 6 países, entre os quais o Brasil, no período de 1997-2000 (Sader et al., 2002). Nesse estudo, *K. pneumoniae* foi o quarto agente infeccioso mais frequente (abaixo de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. coagulase negativa), com taxa de produção de ESBL de 46%.

Especificamente dirigido às infecções hospitalares em neonatos, um estudo epidemiológico foi realizado em 1997-1998 em sete unidades neonatais de São Paulo, Campinas e Rio de Janeiro (Pessoa-Silva et al., 2004), incluindo unidades de terapia intensiva e de cuidados intermediários, e verificou que *K. pneumoniae* foi o quarto agente mais frequente (abaixo de *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *Enterobacter* spp. e *Staphylococcus aureus*), correspondendo a 10% dos isolados.

## **1.2. Tipagem molecular**

A caracterização clonal dos isolados bacterianos é uma ferramenta importante para o esclarecimento e controle de surtos e endemias. As técnicas de tipagem molecular são de grande aplicação nos estudos de linhagem clonal da *K. pneumoniae*, assim como para outras enterobactérias. A eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis” – PFGE) é uma das técnicas de tipagem molecular mais empregadas para esclarecimento de surtos (Branger et al., 1997; Martins-Loureiro et al., 2001; CDC, 2004; Parsons et al., 2007) e também de situações endêmicas (Mosqueda-Gómez et al., 2008). Nessa técnica, extratos de DNA de diferentes isolados de uma espécie bacteriana são submetidos a clivagem por uma enzima de restrição e depois os fragmentos obtidos são comparados conforme sua migração em um gel de agarose, estimulada por corrente elétrica. O grau de similaridade entre os tamanhos dos fragmentos obtidos demonstra a maior ou menor probabilidade de relação clonal entre os isolados analisados (Tenover et al., 1995).

### 1.3. Elementos genéticos móveis

O material genético da *K. pneumoniae* consiste, como ocorre para as demais enterobactérias, em um único cromossomo e múltiplos plasmídios de tamanhos variados, dispersos pelo citoplasma. Os plasmídios são elementos genéticos que se replicam de forma independente do cromossomo da bactéria. Não são fatores de virulência por si, mas podem conter genes que exercem função primordial na patogênese (Donnenberg, 2005). Além de se replicarem de forma independente, os plasmídios também podem ser autônomos na sua capacidade de se transportarem de uma bactéria para outra, inclusive entre bactérias de gêneros distintos (Sirot et al., 1991), codificando sistemas elaborados de produção de pili para transferência de DNA. Assim, situações endêmicas de multirresistência podem ocorrer durante anos pela disseminação de plasmídios portando genes de resistência, entre diversas cepas bacterianas (Mosqueda-Gómez et al., 2008).

A emergência e disseminação de plasmídios que carregam genes de resistência tem sido um fator importante para o aparecimento da resistência concomitante a múltiplos antimicrobianos na mesma bactéria. Esses genes de resistência podem também estar presentes em outros elementos genéticos móveis, como transposons, que facilitam sua inserção em plasmídios e cromossomos, ou integrons, cujos potentes genes promotores causam expressão em larga escala dos genes de resistência neles inseridos (Poirel et al., 2008).

#### 1.4. Beta-lactamases de espectro estendido

Beta-lactamases são enzimas que clivam a ligação amida do anel beta-lactâmico, tornando o antimicrobiano inócuo para a bactéria. A produção de beta-lactamases é uma das principais causas de resistência dos Gram negativos a antimicrobianos.

A beta-lactamase é classificada como de espectro estendido (ESBL) quando confere resistência a penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, e aztreonam (mas não a cefamicinas e carbapenêmicos), e é inibida por inibidores de beta-lactamase, como o ácido clavulânico.

Os primeiros relatos de bactérias produtoras de ESBL ocorreram na Europa no início da década de 80 (Then et al., 1983; Knothe et al., 1983), e atualmente elas são descritas em mais de 30 países, distribuídos por todos os continentes. Em mais de 75% dos estudos sobre ESBL a bactéria relatada é *Klebsiella pneumoniae*. Uma das explicações sugeridas para a predileção das ESBL por *Klebsiella* sp. é que os genes ESBL são frequentemente encontrados em plasmídios grandes, e esse tipo de plasmídio é comum em *Klebsiella* sp. Outro fator a se considerar é a notória adaptação da *Klebsiella* sp. ao ambiente hospitalar, pois ela sobrevive nas mãos e em superfícies inanimadas por mais tempo que as demais enterobactérias, facilitando a transmissão cruzada e a disseminação (Paterson e Bonomo, 2005).

As beta-lactamases são classificadas segundo dois esquemas: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros. A classificação de Ambler divide as beta-lactamases em quatro classes principais (A a D), com base na similaridade na composição de aminoácidos. Já a classificação de



Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as beta-lactamases conforme a similaridade funcional, também em quatro grupos principais e múltiplos subgrupos. A classificação de Bush-Jacoby-Medeiros é mais útil para o clínico e para o microbiologista clínico, pois considera os substratos beta-lactâmicos e os inibidores de beta-lactamase que são clinicamente relevantes.

As beta-lactamases chamadas de espectro estendido ganharam esse nome devido à resistência que conferem às cefalosporinas de terceira geração. No início dos anos 80 esses antimicrobianos, como cefotaxima e ceftriaxona, foram lançados com grande sucesso, pois além de apresentarem a vantagem da baixa toxicidade (quando comparados aos aminoglicosídeos), também se mostravam eficazes contra bactérias produtoras de beta-lactamases que hidrolisavam outros antimicrobianos beta-lactâmicos. Mas já em 1983 se deu o primeiro relato de beta-lactamase capaz de hidrolisar as cefalosporinas de terceira geração, e nos anos seguintes apareceram mais diversas beta-lactamases chamadas de espectro estendido (ESBL). Atualmente já há mais de 200 ESBL caracterizadas, e sua nomenclatura pode ser facilmente acessada pelo site <http://www.lahey.org/studies/webt.htm> (Paterson e Bonomo, 2005).

Os grupos principais de beta-lactamases são: as do tipo SHV; as do tipo TEM; as do tipo CTX-M; as do tipo OXA; e as demais, que são de menor impacto clínico no momento atual e estão agrupadas como “outras beta-lactamases”.

As ESBL tipo SHV são muito frequentes em isolados clínicos e se distribuem por todos os continentes. Já foram identificadas em grande variedade de enterobactérias, e também em Gram negativos não fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

As ESBL tipo TEM derivam das beta-lactamases TEM-1 e TEM-2. Mais de uma centena de beta-lactamases tipo TEM já foram descritas, a maioria delas ESBL. A primeira identificação de ESBL tipo TEM ocorreu na Inglaterra em 1982: a cepa produtora dessa enzima apareceu em uma unidade neonatal, na qual estava ocorrendo inicialmente um surto por *Klebsiella oxytoca* produtora de TEM-1. Após uso de ceftazidima em larga escala para tratamento das infecções durante o surto, apareceram isolados de *K. oxytoca* produtora da nova uma nova beta-lactamase, ESBL tipo TEM, exemplificando a emergência de ESBL como decorrência da pressão seletiva das cefalosporinas de terceira geração (Paterson e Bonomo, 2005).

As ESBL tipo CTX-M são atualmente as mais prevalentes em diversas partes do mundo (Bonnet, 2004). Foram descritas inicialmente na segunda metade dos anos 80 e rapidamente formaram uma família crescente de ESBL detectadas em várias enterobactérias. Também são identificadas em espécimes ambientais do gênero *Kluyvera*. Em isolados clínicos, os genes que codificam CTX-M geralmente se localizam em plasmídios, que frequentemente também carregam os genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, ou outros genes que codificam outras ESBL. Esses plasmídios também podem carregar genes de resistência para outros antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfas, trimetoprim e tetraciclina. Plasmídios que codificam CTX-M são geralmente transmissíveis por conjugação *in vitro*, mostrando sua facilidade de disseminação. Também já foram observadas no Japão inserções cromossômicas do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> em isolado clínico de *Escherichia coli*, o que sugere a mobilidade desse gene entre plasmídios e também de plasmídio para cromossomo.

A resistência a ceftazidima é usada na prática como indicador da presença de ESBL, e é o melhor substrato para ESBL tipo TEM e SHV. Redução do halo de

inibição por ceftazidima no método de disco-difusão indica suspeita de produção de ESBL. Porém, quando a ceftazidima é testada isoladamente, pode haver falha na detecção de cepas produtoras de ESBL CTX-M. Para reduzir esse erro, é recomendado testar concomitantemente a susceptibilidade a cefotaxima. De qualquer maneira, após teste de rastreamento positivo, é necessário teste fenotípico confirmatório, que demonstre a característica inibição da ESBL por ácido clavulânico (Paterson e Bonomo, 2005; CLSI, 2009).

As beta-lactamases tipo OXA têm esse nome devido a sua eficiência na hidrólise de oxacilina. São produzidas principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, mas também ocorrem em outros Gram negativos.

Já foi também descrita uma variedade de outras beta-lactamases mediadas por plasmídios ou associadas a integrons, e algumas codificadas em cromossomos: enzimas tipo PER, VEB, GES, TLA, SFO, IBC e outras. Assim, o que se verifica é que as beta-lactamases de espectro estendido são uma numerosa e diversificada família de enzimas que vêm sendo identificadas há mais de 20 anos, e *K. pneumoniae* é a espécie bacteriana na qual mais têm sido relatadas essas enzimas. Os genes que codificam as ESBL podem se inserir em estruturas genéticas móveis diversificadas, que podem carregar concomitantemente genes de resistência a outros antimicrobianos e podem também ser transmitidas entre bactérias (inclusive de espécies diferentes). Isso faz das ESBL um diferencial extremamente importante para adaptação dos Gram negativos ao ambiente hospitalar e para a disseminação da multirresistência. A detecção fenotípica da produção de ESBL exige testes manuais específicos, sendo mais complexa do que para a maioria dos outros mecanismos de resistência. Isso facilita a ocorrência de falhas de antibiograma, induzindo a

resultados de falsa sensibilidade, o que faz da detecção de ESBL um desafio muito importante para o controle de qualidade nos laboratórios de microbiologia, como já foi demonstrado em países da América Latina (Corso et al., 2008).

### **1.5. Fatores de risco para colonização de neonatos por *K. pneumoniae* ESBL**

Alguns estudos em neonatos (Desimoni et al., 2004; de Almeida et al., 2005) e também em adultos (Peña et al., 1998) já mostraram evidências de que a colonização intestinal precede a infecção invasiva por *K. pneumoniae* ESBL, embora a taxa de infecção seja baixa mesmo entre os colonizados (Desimoni et al., 2004). Isso reforça um princípio fundamental do controle de infecções hospitalares, de que a prevenção das infecções por bactérias multirresistentes começa na prevenção da disseminação da colonização entre os pacientes (Bisson et al., 2002).

A maioria dos surtos por *K. pneumoniae* ESBL em neonatos, que geraram estudos sobre fatores de risco, ocorreu em unidades de terapia intensiva. Alguns desses estudos verificaram os fatores de risco de colonização não só para *K. pneumoniae*, mas para o conjunto das enterobactérias produtoras de ESBL, ou para o conjunto dos Gram negativos multirresistentes. Nesses relatos, o fator de risco que tem sido apontado de forma mais consistente é o tempo de permanência na UTI neonatal, que persistiu como fator independentemente associado após análise multivariada, em estudos de corte transversal (Pessoa-Silva et al., 2003; Mammina et

al., 2006) e caso-controle aninhado em estudo de corte transversal (Gupta et al., 2004; Boo et al., 2005).

Em um desses estudos (Boo et al., 2005) o tempo de permanência e a ocorrência de pneumonia precoce antes da detecção da colonização foram apontados como fatores de risco independentes na análise multivariada, porém na discussão dos resultados os autores consideram que ambos os fatores de risco identificados se explicariam pela maior exposição dos pacientes aos profissionais e ao ambiente contaminado. Este mesmo estudo avaliou associação do uso de leite materno em mamadeira, e o resultado não foi significativo.

Em outro estudo (Gupta et al., 2004), identificou-se colonização crônica das mãos de duas profissionais que usavam unhas artificiais e foram apontados como fatores de risco independentes na análise multivariada o tempo de permanência na UTI e a exposição a essas profissionais. Mammina et al. (2006) verificaram, em situação endêmica em UTI neonatal, que a colonização por Gram negativos multirresistentes se associava de forma independente ao tempo de permanência, baixo peso e menor idade gestacional, e observaram que na análise univariada o aleitamento materno favoreceu a colonização por Gram negativos mais sensíveis aos antimicrobianos.

Um estudo brasileiro (Pessoa-Silva et al., 2003) mostrou associação independente do tempo de permanência e do uso prévio de aminoglicosídeo mais cefalosporina de terceira geração com colonização por *K. pneumoniae* ESBL durante surto. No mesmo estudo, a colonização prévia e uso de cateter central se associaram à infecção por esse agente.

Um estudo recente, de corte transversal e com análise multivariada, indicou o uso prévio de ampicilina mais gentamicina como único fator associado de forma independente à colonização durante surto por *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens* ESBL (Crivaro et al., 2007).

Portanto, o número de estudos é restrito e todos eles refletem os múltiplos fatores relacionados à susceptibilidade a infecções de neonatos em graves condições clínicas. Ainda assim é possível definir que uso de antimicrobianos e exposição a profissionais e ambiente contaminados parecem ser os fatores determinantes para a colonização dos neonatos por bactérias multirresistentes.

## **2. Objetivo**

O objetivo do presente estudo foi investigar os fatores associados ao risco de colonização por *K. pneumoniae* produtora de ESBL durante surto ocorrido em unidade neonatal de cuidados intermediários.

Um objetivo secundário foi caracterizar o surto quanto à clonalidade dos isolados de *K. pneumoniae*.

### **3. Método**

O estudo foi realizado na unidade neonatal de risco intermediário do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). O HU-USP é um hospital de ensino de nível de atendimento secundário, com 235 leitos distribuídos entre as Divisões de Pediatria, Clínica Cirúrgica, Clínica Médica e Clínica Obstétrica. São realizados em média 300 partos por mês. Na unidade neonatal de risco intermediário, onde se realizou o estudo, ficam internados os recém-nascidos portadores de doenças de baixa morbidade, como icterícia neonatal, síndrome do desconforto respiratório, risco infeccioso materno e outras, sem necessidade de procedimentos invasivos ou monitoramento intensivo. Essa unidade de internação diferencia-se do alojamento conjunto, onde os recém-nascidos saudáveis ficam internados na companhia de suas mães, e também se diferencia da unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal, para onde são encaminhados os casos de maior gravidade, e de onde os pacientes retornam para a unidade de risco intermediário após melhora clínica. A unidade neonatal de cuidados intermediários tem 17 leitos e ocupação média de 450 pacientes-dia/mês, enquanto a UTI neonatal tem seis leitos.

A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HU-USP realiza vigilância ativa das infecções hospitalares em todas as unidades de internação, seguindo os critérios de definição de infecções hospitalares recomendados pelo CDC (Garner et al, 1988). Nos anos de 2004 e 2005, a densidade mensal média de incidência de infecções hospitalares na unidade neonatal de risco intermediário foi de 14,6 infecções/1000 pacientes-dia, enquanto na UTI neonatal a densidade de incidência de infecções hospitalares foi de 38,9 infecções/1000 pacientes-dia. Os



patógenos identificados nessas infecções estão descritos nas Tabelas I e II. Esses dados indicam que o padrão de ocorrência das infecções hospitalares é diferente entre as duas unidades de internação.

Tabela I: Agentes identificados nas infecções hospitalares, segundo material clínico.  
Unidade neonatal de risco intermediário, HU-USP, 2004-2005.

<b>Agente</b>	<b>Sangue</b>	<b>Urina</b>	<b>Sec. ocular</b>	<b>Sec. traqueal</b>	<b>Sec. pele</b>	<b>Total</b>	<b>(%)</b>
<i>K. pneumoniae</i>	5	7	1	-	-	13	(33)
<i>Staphylococcus</i> sp coagulase negativa	4	-	3	-	1	8	(21)
<i>Enterobacter</i> spp	1	1	2	-	-	4	(10)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	-	2	-	-	3	(8)
<i>Escherichia coli</i>	1	1	-	-	-	2	(5)
<i>Enterococcus</i> spp	1	1	-	-	-	2	(5)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	1	-	-	1	(3)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	-	-	-	-	1	(3)
<i>Serratia marcescens</i>	1	-	-	-	-	1	(3)
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	1	-	-	1	(3)
<i>Candida albicans</i>	1	-	-	-	-	1	(3)
Vírus Sincicial Respiratório	-	-	-	2	-	2	(5)
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>39</b>	<b>(100)</b>

Fonte: Etiologia das Infecções Hospitalares na Divisão de Pediatria 2004-2005:  
Relatório da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HU/USP.

Tabela II: Agentes identificados nas infecções hospitalares, segundo material clínico.

UTI neonatal, HU-USP, 2004-2005.

Agente	Sangue	Urina	Secreção ocular	Líquido ascítico	Líquor	Ponta cateter	Abscesso fechado	Total	(%)
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	1	1	1	-	-	5	(12)
<i>Enterobacter spp</i>	1	3	-	-	-	1	-	5	(12)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	1	-	-	-	1	4	(10)
<i>Candida parapsilosis</i>	3	1	-	-	-	-	-	4	(10)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	-	-	-	-	-	-	3	(7)
<i>Candida albicans</i>	3	-	-	-	-	-	-	3	(7)
<i>Escherichia coli</i>	-	1	-	1	-	-	-	2	(5)
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	-	-	-	-	-	-	2	(5)
<i>Candida lusitanae</i>	2	-	-	-	-	-	-	2	(5)
<i>Enterococcus spp</i>	2	-	-	-	-	-	-	2	(5)
<i>Staphylococcus sp coagulase negativa</i>	1	-	1	-	-	-	-	2	(5)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	1	-	-	-	-	-	1	(2)
<i>Citrobacter freundii</i>	-	1	-	-	-	-	-	1	(2)
<i>Serratia marcescens</i>	-	1	-	-	-	-	-	1	(2)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	(2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	1	-	-	-	-	1	(2)
<i>Micrococcus sp</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	(2)
Citomegalovírus	1	-	-	-	-	-	-	1	(2)
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>41</b>	<b>(100)</b>

Fonte: Etiologia das Infecções Hospitalares na Divisão de Pediatria 2004-2005:

Relatório da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HU/USP.

### **3.1. Descrição do surto**

Entre agosto e novembro de 2004, ocorreu um surto de *K. pneumoniae* ESBL na unidade neonatal de risco intermediário, envolvendo sete infecções (três infecções da corrente sanguínea, duas infecções do trato urinário e duas conjuntivites) e dois casos de colonização do períneo, com a bactéria detectada na urina colhida em saco coletor. A infecção por *K. pneumoniae* ESBL contribuiu para evolução clínica desfavorável e óbito em um dos casos de infecção da corrente sanguínea.

As medidas iniciais para evitar disseminação foram informação da equipe multiprofissional da unidade, reforço das precauções padrão e de contato e disponibilização de álcool-gel para higiene das mãos. Tendas de oxigênio, balanças, mobiliário, banheiras e bancadas para troca de fraldas passaram a ser desinfetadas com álcool a 70% a cada uso. Termômetros e estetoscópios já eram de uso exclusivo para cada paciente. A equipe de enfermagem foi orientada a não compartilhar frascos de creme hidratante entre os pacientes. A equipe médica foi alertada para o uso racional de antimicrobianos, especialmente a restrição de cefalosporinas de terceira geração. Meropenem passou a ser utilizado para tratamento inicial empírico das sepses neonatais tardias até estabilização da situação do surto.

A investigação do surto incluiu a identificação de possíveis fatores de risco em comum e realização de procedimentos invasivos entre os pacientes afetados, sem que se identificasse nenhum fator comum a todos os casos.

Os produtos hospitalares e suas embalagens foram examinados, e foram revisados os métodos de processamento dos materiais reprocessáveis. Cremes armazenados em frascos de uso comum foram coletados e encaminhados para

culturas, resultando negativas. Apesar das medidas, o aparecimento de novos casos persistiu.

Entre novembro de 2004 e fevereiro de 2005 todos os pacientes internados na unidade neonatal de cuidados intermediários passaram a ser rastreados para colonização por cultura de “swab” retal uma vez por semana. Como continuavam a aparecer casos novos de colonização, em janeiro de 2005 foi realizada inspeção das mãos dos 48 profissionais que atuam na unidade, sendo coletados “swabs” de superfície das mãos de nove profissionais que apresentavam lesões dermatológicas.

No dia primeiro de fevereiro de 2005 se obteve cultura positiva para *K. pneumoniae* ESBL das mãos de uma técnica de enfermagem que apresentava lesão pequena e seca em uma unha, compatível com onicomicose. Raspado da lesão foi encaminhado para exame direto e cultura, demonstrando *Candida* sp. Esta profissional foi afastada do contato com pacientes durante uma semana, recebendo ciprofloxacina oral e tópica, além de fluconazol oral para tratamento da candidíase. A lesão apresentou rápida melhora, e após uma semana de uso dos antimicrobianos, a profissional já apresentou cultura das mãos negativa para *K. pneumoniae* ESBL, retornando às suas atividades habituais. Não se considerou necessário investigar se a profissional apresentava colonização intestinal. Culturas semanais de vigilância continuaram a ser colhidas de todos os pacientes internados na unidade neonatal por mais quatro semanas consecutivas, e não apareceu nenhum caso novo de colonização. As culturas de vigilância foram então interrompidas. Após mais um mês foi realizado o último rastreamento por cultura de “swab” retal de todos os pacientes internados, resultando todas negativas. Desde então não se detectou mais nenhum caso de infecção ou colonização por *K. pneumoniae* ESBL nessa unidade neonatal.

Curiosamente, verificamos que durante os meses do surto houve redução na densidade de incidência de infecções hospitalares na unidade neonatal, permanecendo abaixo da média dos anos anteriores, voltando a se elevar após a resolução do surto (Gráfico I).

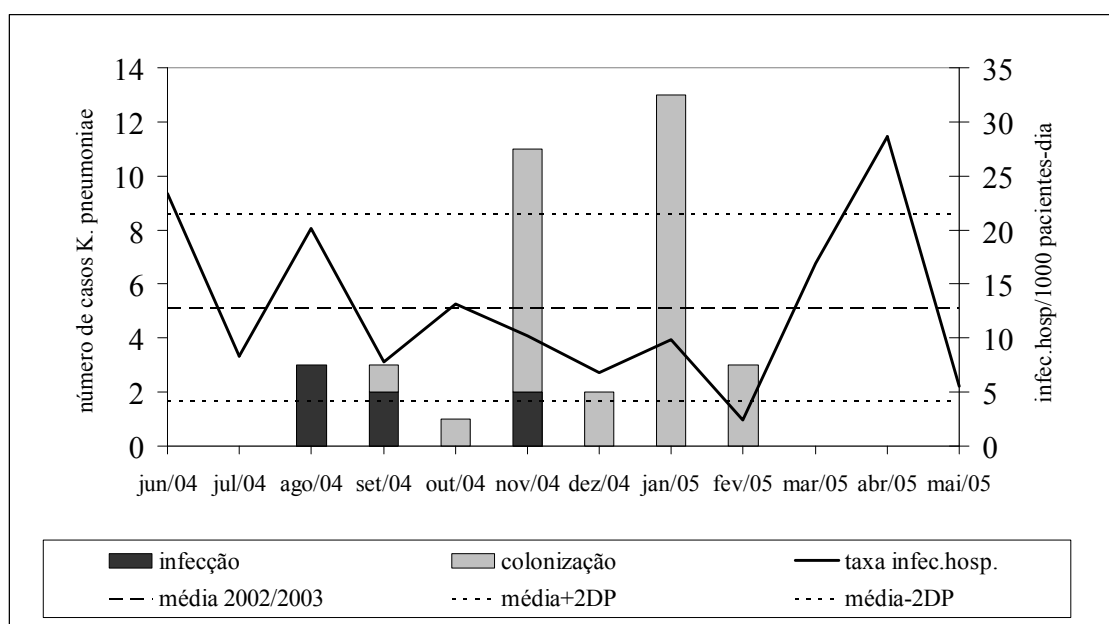


Gráfico I: Casos de colonização e infecção por *K. pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido e taxas mensais de infecção hospitalar. Unidade neonatal de risco intermediário, HU-USP, junho/2004 a maio/2005. Fonte: Cassettari et al., 2006.

### 3.2. Análise genética e microbiológica

A identificação dos isolados e os testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados pelo sistema Vitek (BioMérieux, Hazelwood, MO, USA). O rastreamento fenotípico para produção de ESBL foi feito pelo teste de duplo-disco sinergismo

(CLSI, 2009), e a caracterização genética foi feita por eletroforese de campo pulsado (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis” - PFGE) (Tenover et al., 1995; CDC, 2004).

O polimorfismo das bandas geradas por PFGE foi analisado através dos programas GelWorks 1D Advanced and GelWorks 1D Database (UVP Bioimaging Systems, Upland, CA, USA), e os padrões de PFGE foram agrupados segundo o coeficiente de similaridade de Dice.

### **3.3. Estudo de corte transversal**

Todos os pacientes admitidos na unidade neonatal entre novembro de 2004 e janeiro de 2005 foram expostos ao contato com a profissional colonizada. Realizamos um estudo de corte transversal para investigar, entre os pacientes rastreados, os potenciais fatores de risco associados à aquisição do agente. As informações foram obtidas por revisão dos prontuários, registrando as seguintes variáveis:

- Sexo;
- Prematuridade, segundo o método de Capurro (Capurro et al., 1978);
- Peso ao nascer;
- Tipo de parto (vaginal ou cesáreo);
- Antimicrobianos utilizados até a data da cultura;
- Aleitamento materno até a data da cultura de “swab” retal (considerado positivo quando houve dois momentos ou mais em que foi oferecido o seio materno ao recém-nascido);
- Tempo de permanência hospitalar até a data da cultura;

- Estadia prévia na UTI neonatal.

Como a cultura de “swab” retal foi realizada semanalmente para todos os recém-nascidos internados na unidade, a data da cultura foi definida como a data da última cultura para os casos negativos, e como a data da primeira cultura positiva para os positivos.

### **3.4. Análise estatística**

Todas as variáveis analisadas foram categorizadas. Realizamos análise bivariada para estimativa inicial da associação entre os potenciais fatores de risco e a colonização por *K. pneumoniae*. Associações estatísticas foram examinadas por teste de qui-quadrado, ou teste de qui-quadrado para tendência linear quando as variáveis apresentavam mais de duas categorias ordenadas.

A força da associação foi verificada pelo cálculo das odds ratios (OR) com intervalos de 95% de confiança (IC95%). Análise multivariada foi realizada por regressão logística múltipla para verificar quais fatores se associaram ao risco de colonização de forma independente. Variáveis que apresentaram valor de  $P < 0,25$  na análise bivariada foram selecionadas para análise multivariada. As variáveis foram mantidas no modelo multivariado final quando obtiveram  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando STATA 9.0 (StataCorp, College Station, TX, USA).

### **3.5. Considerações éticas**

Foram utilizados dados secundários, obtidos de prontuários de pacientes ou decorrentes das atividades de controle de infecções hospitalares. O anonimato dos pacientes e a confidencialidade foram garantidas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP (Anexo I).



## **4. Resultados**

### **4.1. Estudo de corte transversal**

Foram incluídos 120 pacientes no estudo, dos quais 27 (22,5%) estavam colonizados. As características dos 120 pacientes participantes estão descritas na Tabela III: 56% eram do sexo feminino; 36% nasceram de parto cesáreo; 24% apresentaram peso ao nascer igual ou inferior a 2500 g; 31% eram prematuros; 30% tiveram internação na UTI neonatal antes de serem admitidos na unidade de risco intermediário; 90% receberam aleitamento materno; 47% receberam antimicrobianos antes da data da cultura. O tempo de permanência até a data da cultura foi de até três dias para 28% dos participantes, de 4 a 10 dias para 53% e maior ou igual a onze dias para 19%.

Na análise bivariada (Tabela IV) tipo de parto, tempo de permanência, uso prévio de antimicrobianos e estadia prévia em UTI mostraram associações estatisticamente significativas com chance de colonização ( $P < 0,05$ ).

Após ajuste para uso prévio de antimicrobianos (Tabela V), o único fator que demonstrou aumento da força de associação foi aleitamento materno, enquanto todos os demais perderam força de associação, principalmente o tempo de permanência, que na análise bivariada sem ajuste apresentava  $P < 0,001$ .

Todas as variáveis verificadas na análise bivariada foram associadas ao risco de colonização com  $P < 0,25$  e foram posteriormente examinadas por análise de regressão logística. Apenas uso prévio de antimicrobianos e aleitamento materno

persistiram como fatores independentemente associados com colonização na análise multivariada.

A OR de uso de antimicrobianos ajustada para aleitamento materno foi 12,3 (IC95%: 3,66 - 41.2;  $P < 0,001$ ). A OR de aleitamento materno ajustada para uso de antimicrobianos foi 0,22 (IC95%: 0,047 – 0,99;  $P = 0,049$ ).

Tabela III: Características dos recém-nascidos participantes do estudo.

<b>Fator de risco</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Uso de antimicrobiano prévio</b>		
Não	64	(53)
Sim	56	(47)
<b>Sexo</b>		
Masculino	53	(44)
Feminino	67	(56)
<b>Tipo de parto</b>		
Vaginal	77	(64)
Cesáreo	43	(36)
<b>Peso ao nascer, g</b>		
>2500	91	(76)
≤2500	29	(24)
<b>Prematuridade</b>		
Não	83	(69)
Sim	37	(31)
<b>Aleitamento materno</b>		
Não	12	(10)
Sim	108	(90)
<b>Tempo de permanência, d</b>		
≤3	34	(28)
4-10	63	(53)
≥11	23	(19)
<b>Estadia prévia na UTI</b>		
Não	84	(70)
Sim	36	(30)

Tabela IV: Análise bivariada dos fatores de risco para aquisição de *K. pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido.

Fator de risco	Colonizados		Não		OR	IC 95%	p
	n=27		colonizados				
	n	(%)	n	(%)			
<b>Uso de antimicrobiano prévio</b>							
Não	4	(6)	60	(94)	1		
Sim	23	(41)	33	(59)	10,45	(3,14-44,2)	<0,001
<b>Sexo</b>							
Masculino	8	(15)	45	(85)	1		
Feminino	19	(28)	48	(72)	2,23	(0,89-5,59)	0,09
<b>Tipo de parto</b>							
Vaginal	13	(17)	64	(83)	1		
Cesáreo	14	(33)	29	(67)	2,38	(0,99-5,69)	0,05
<b>Peso ao nascer, g</b>							
>2500	17	(19)	74	(81)	1		
≤2500	10	(34)	19	(66)	2,29	(0,90-5,80)	0,08
<b>Prematuridade</b>							
Não	15	(18)	68	(82)	1		
Sim	12	(32)	25	(68)	2,18	(0,90-5,28)	0,09
<b>Aleitamento materno</b>							
Não	5	(42)	7	(58)	1		
Sim	22	(20)	86	(80)	0,36	(0,10-1,24)	0,10
<b>Tempo de permanência, d</b>							
≤3	3	(9)	31	(91)	1		
4-10	13	(21)	50	(79)	2,69	(0,71-10,19)	
≥11	11	(48)	12	(52)	9,47	(2,24-40,0)	<0,001*
<b>Estadia prévia na UTI</b>							
Não	13	(15)	71	(85)	1		
Sim	14	(39)	22	(61)	3,47	(1,42-8,49)	0,006

\*teste de  $X^2$  para tendência linear

Tabela V: Análise bivariada dos fatores de risco para colonização por *K. pneumoniae* ESBL, ajustada para uso prévio de antimicrobianos.

Fator de risco	Com uso prévio de antimicrobianos		Sem uso prévio de antimicrobianos		Associação ajustada	
	Total	n (%) Colonizado	Total	n (%) Colonizado	OR (IC95%)	<i>p</i>
<b>Sexo</b>						
Masculino	22	8 (36)	31	0 -	1	
Feminino	34	15 (44)	33	4 (12)	2.09 (0.77-5.68)	0.15
<b>Tipo de parto</b>						
Vaginal	31	11 (35)	46	2 (4)	1	
Cesáreo	25	12 (48)	18	2 (11)	1.87 (0.77-4.86)	0.20
<b>Peso ao nascer, g</b>						
>2500	39	15 (38)	52	2 (4)	1	
≤2500	17	8 (47)	12	2 (17)	1.89 (0.68-5.28)	0.22
<b>Prematuridade</b>						
Não	36	13 (36)	47	2 (4)	1	
Sim	20	10 (50)	17	2 (12)	1.99 (0.75-5.32)	0.17
<b>Aleitamento materno</b>						
Não	5	5 (100)	7	0 -	1	
Sim	51	18 (35)	57	4 (7)	0.22 (0.05-0.99)	0.05
<b>Tempo permanência, d</b>						
≤ 3	3	0 -	31	3 (10)	1	
4-10	32	13 (41)	31	0 -	0.96 (0.20-4.63)	
≥ 11	21	10 (48)	2	1 (50)	1.89 (0.32-11.03)	0.31*
<b>Estadia prévia na UTI</b>						
Não	31	10 (32)	53	3 (6)	1	
Sim	25	13 (52)	11	1 (9)	2.15 (0.81-5.71)	0.13

\*teste de  $X^2$  para tendência linear

Os antimicrobianos mais utilizados, tanto entre pacientes colonizados como não colonizados, foram penicilina e amicacina (Tabela VI).

Tabela VI: Antimicrobianos utilizados até a data da cultura.

Antimicrobiano	Colonizado n=27		Não colonizado n=93	
	n	(%)	n	(%)
Amicacina	21	(78)	26	(28)
Penicilina	20	(74)	27	(29)
Cefotaxima	4	(15)	7	(8)
Ampicilina	3	(11)	8	(9)
Oxacilina	2	(7)	2	(2)
Vancomicina	2	(7)	2	(2)
Imipenem	1	(4)	1	(1)
Meropenem	0	-	1	(1)
Fluconazol	1	(4)	0	-
Anfotericina B	0	-	1	(1)

#### 4.2. Análise genética e microbiológica

Entre agosto de 2004 e janeiro de 2005 foram obtidos 37 isolados de *K. pneumoniae*: sete de pacientes infectados, 29 de pacientes colonizados e um isolado da profissional de saúde. Todos os isolados apresentaram fenótipo ESBL, com

resistência a penicilinas e cefalosporinas e sensibilidade a carbapenêmicos e quinolonas. Seis tipos principais (A a F) foram observados por PFGE, conforme o método de Tenover et al.. Cinco subtipos (A1-A4 e B1) foram identificados segundo o coeficiente de similaridade de Dice (Figura 1).

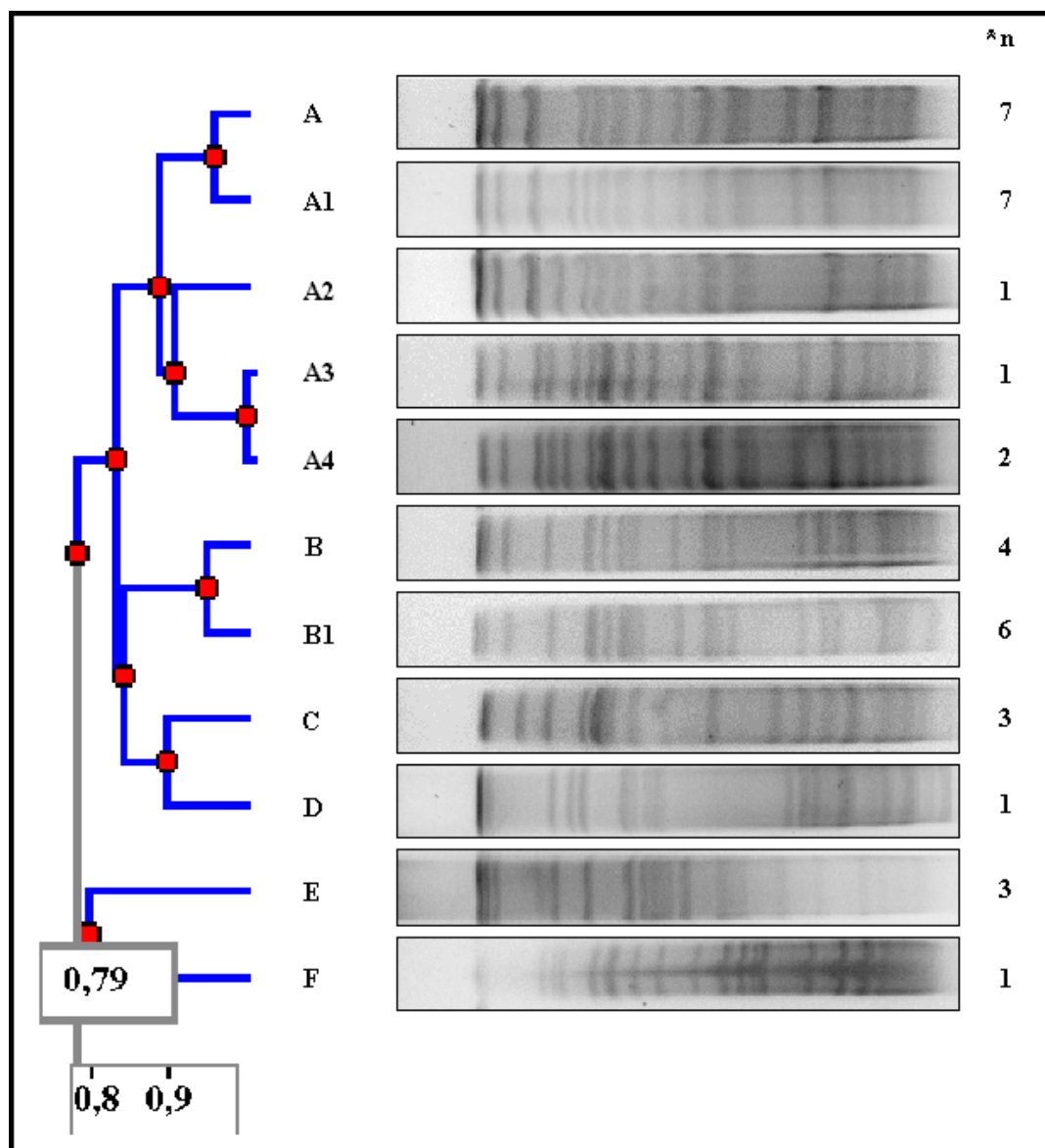


Figura 1: Estimativa da relação genética entre as cepas de *K. pneumoniae*, conforme o coeficiente de similaridade de Dice. O número de isolados exibindo cada padrão PFGE está na coluna n\*. Figura gentilmente cedida por Milena Dropa, FSP-USP.

Os padrões PFGE A (N=7), C (N=1) e F (N=1) foram implicados na primeira etapa do surto, enquanto PFGE B foi identificado com frequência nas culturas de vigilância (Gráfico 2). As cepas com padrão PFGE A foram as mais frequentemente isoladas (N=9), sendo recuperadas tanto de amostras clínicas como dos “swabs” de vigilância, inclusive o das mãos da profissional de saúde.

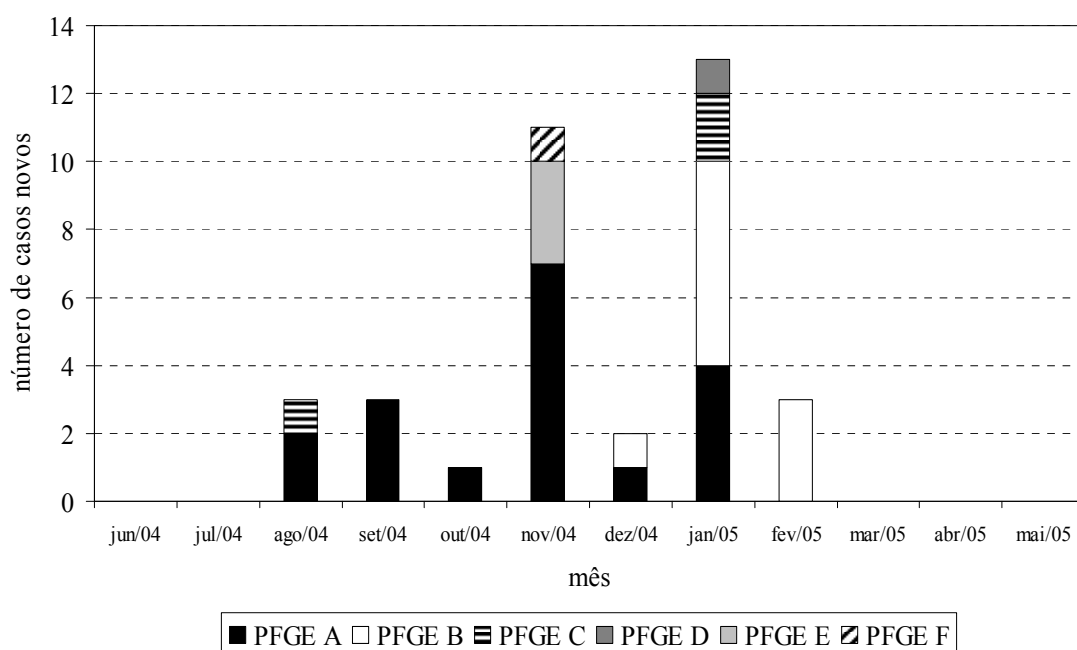


Gráfico 2: Padrões de PFGE dos isolados de *K. pneumoniae* ESBL nos casos de infecção ou colonização durante surto na unidade neonatal de risco intermediário.



## 5. Discussão

A oportunidade para realização deste trabalho surgiu de uma rara ocorrência de surto por *K. pneumoniae* ESBL em unidade neonatal de risco intermediário, com identificação de fonte comum de disseminação. O estudo é original por envolver neonatos não internados em unidade de terapia intensiva. As culturas de rastreamento colhidas de todos os pacientes internados na ocasião da investigação e controle do surto permitiram a realização de estudo epidemiológico de corte transversal para identificação de fatores de risco para colonização. Verificamos na análise multivariada que o uso de antimicrobianos predispôs à colonização, e o aleitamento materno foi protetor. Os antimicrobianos mais utilizados foram penicilina e amicacina.

A maior limitação deste trabalho é o número relativamente pequeno da amostra, que causou a estimativa de intervalos de confiança largos e pode ter induzido a erros de tipo II na análise estatística. Para o aleitamento materno, essa limitação é crítica, já que entre os 120 pacientes incluídos no estudo apenas doze não receberam essa forma de alimentação em algum momento antes da cultura. Entre os recém-nascidos que receberam antimicrobianos, 18 dos 51 que receberam aleitamento materno eram colonizados, enquanto todos os cinco que não receberam o aleitamento materno se colonizaram, sendo essa associação estatisticamente significativa, apesar do pequeno número de casos. No entanto, a estimativa da força de associação é muito imprecisa.

O estudo também está sujeito a viés de seleção, já que as culturas de rastreamento eram colhidas uma vez por semana e pacientes que permaneceram

internados por seis dias ou menos tiveram mais chance de serem excluídos do estudo por não terem culturas colhidas. Esse viés pode distorcer a importância do tempo de permanência.

Outro possível viés de seleção diz respeito à exposição dos recém-nascidos à profissional cronicamente colonizada. Consideramos que a exposição a esta profissional foi determinante para a colonização dos recém-nascidos, já que todas as medidas recomendadas haviam sido adotadas para controle da disseminação, sem sucesso, até verificarmos imediata resolução do surto após tratamento da profissional colonizada. Entretanto, embora a dinâmica de trabalho nessa unidade exponha todos os pacientes a todos os profissionais, esse contato não foi medido e nem mesmo observado, sendo possível que casos de não colonização tenham ocorrido simplesmente porque não houve exposição de parte da amostra à profissional. Isso distorceria os resultados de forma imprevisível, a depender do tipo de paciente que não foi atendido por essa profissional.

Há também no estudo limitações que podem ter causado vieses de classificação. O mais importante deles é com relação ao aleitamento materno. O recém-nascido foi classificado como recebendo aleitamento materno quando mamou em duas ocasiões ou mais no seio materno. Porém esse critério pode ser contestado, já que entre o aleitamento materno exclusivo e o aleitamento artificial exclusivo há uma gama enorme de variações no padrão de alimentação dos recém-nascidos internados, incluindo o aleitamento com leite materno administrado em mamadeira, e essas variações não foram consideradas, levando ao risco de misturar no mesmo grupo recém-nascidos com alimentações muito diferentes. A classificação mais detalhada não foi realizada porque o objetivo deste estudo era fazer uma

aproximação inicial do possível efeito do aleitamento materno, e além disso o número restrito de pacientes não permitiria a classificação em número tão grande de categorias de alimentação.

Ainda quanto ao aleitamento materno, um possível viés de confusão deve ser considerado em relação a esse fator (verificado como protetor) e o contato dos neonatos com suas mães. O aleitamento materno pode ter servido como um marcador do grau desse contato. Na unidade neonatal de risco intermediário as mães podem participar dos cuidados de seus filhos, como alimentação, troca de fraldas e banho, e o aleitamento pode ter sido um marcador para os recém-nascidos que, em boas condições clínicas e com bom envolvimento de suas mães, foram mais cuidados por elas, trocando mais bactérias com elas e também ficando menos expostas aos cuidados da profissional colonizada.

A grande virtude do estudo é que ele foi realizado sob condições habituais de atendimento, com uma amostra que representa a população real de recém-nascidos que permanecem internados para tratamento de doenças de médio risco, portanto as conclusões deste estudo podem ser melhor generalizadas. Os neonatos incluídos no estudo não eram pacientes críticos, portanto não estavam submetidos a múltiplas exposições, como manipulação de dispositivos invasivos, cirurgias e transferências entre hospitais. Além disso, no processo de controle do surto toda a rotina foi inspecionada, sendo excluída a possibilidade de disseminação da bactéria por falhas grosseiras nas medidas de prevenção, o que garante maior consistência aos resultados. Também não foram feitas análises de subgrupos, sendo incluídos todos os recém-nascidos submetidos a culturas de vigilância no período em questão, e não houve perdas na amostra por falhas na obtenção dos prontuários.

A associação do uso prévio de antimicrobiano com a colonização era esperada, e reforça um conceito bastante consolidado em prevenção de multirresistência bacteriana. A redução do consumo global de antimicrobianos é reconhecida e divulgada como estratégia fundamental para redução do ritmo de desenvolvimento da resistência (Shlaes et al., 1997). Porém, a multiplicidade de fatores de confusão envolvidos fragiliza as evidências nos estudos sobre o assunto. Assim, ainda que não seja original, o resultado deste estudo é importante, pois pode ser generalizado.

Ainda sobre os antimicrobianos, também é interessante termos verificado que os mais utilizados foram predominantemente amicacina e penicilina. Esses antimicrobianos são utilizados atualmente em caráter conservador, refletindo preocupação com o uso racional dos antimicrobianos, e mesmo assim a sua utilização favoreceu a disseminação da bactéria resistente. É possível que o uso desses antimicrobianos, ao reduzir em diversidade e quantidade a flora bacteriana que normalmente coloniza o recém-nascido, tenha criado um ambiente adequado para a instalação e multiplicação de *K. pneumoniae* produtora de ESBL. Isso indica que a otimização do uso deve ser estendida para todas as classes de antimicrobianos, pois todos eles podem interferir na colonização normal.

Diferente do observado nas UTIs neonatais, os neonatos internados na unidade de risco intermediário apresentam condições clínicas que permitem o aleitamento materno, portanto tivemos oportunidade de avaliar seu impacto na colonização. Verificamos que o aleitamento materno mostrou associação com redução do risco de aquisição de *K. pneumoniae* ESBL. Recém-nascidos que recebem aleitamento materno têm mais contato com suas mães e é possível que

sejam menos manipulados por profissionais de saúde. Observamos o aumento da proteção do aleitamento materno após ajuste para uso prévio de antimicrobianos. É possível supor que, para os recém-nascidos que tiveram sua colonização normal modificada pelo uso de antimicrobianos, o aleitamento materno tenha representado tanto um importante reforço à colonização normal pelo contato freqüente com a flora bacteriana materna, como também uma proteção contra o contato com a profissional colonizada e conseqüente aquisição de *K. pneumoniae* ESBL. Infelizmente não tivemos oportunidade de medir o contato entre a profissional e os pacientes, e além disso, o número de recém-nascidos que não receberam o aleitamento materno foi pequeno, portanto essas conclusões não são definitivas. Uma vez que a colonização intestinal de recém-nascidos hospitalizados parece ser afetada por múltiplos fatores (Penders et al., 2006), o papel do aleitamento materno merece maior esclarecimento. Novos estudos poderão ser realizados sobre o assunto a fim de confirmar essa associação, e posteriormente para esclarecer se esse resultado se relaciona a propriedades do leite materno, ao contato físico com a mãe, ou à redução do contato com os profissionais de saúde.

Sobre os resultados microbiológicos da investigação do surto, verificou-se que na fase inicial do surto predominou o PFGE tipo A, que também foi identificado na profissional de saúde, mas a detecção de diferentes genótipos de *K. pneumoniae* ESBL entre os pacientes infectados e colonizados sugere que o surto tenha ocorrido por disseminação de elementos genéticos móveis carregando os genes ESBL entre diversos clones, mais do que pela disseminação de um clone em particular.

Em conclusão, este estudo confirmou resultados de outros trabalhos ao indicar a ocorrência de transmissão de resistência antimicrobiana entre diferentes

clones de bactérias e ao demonstrar o uso de antimicrobianos como fator de risco para colonização pela bactéria resistente. O estudo foi original e seus resultados generalizáveis por investigar os fatores de risco para colonização em recém-nascidos internados em unidade neonatal de risco intermediário. Sua principal contribuição para a assistência foi a confirmação de que uso racional de antimicrobianos e medidas de prevenção de transmissão cruzada de bactérias entre os pacientes através dos profissionais de saúde devem ser tópicos necessariamente abordados na rotina do controle de infecções hospitalares e da prevenção da multirresistência bacteriana. Sua contribuição para o conhecimento existente foi a sugestão de que o papel do aleitamento materno na prevenção da colonização por bactérias multirresistentes deve ser melhor investigado.

## Referências

1. Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, Gentile F, Scarcella A, Triassi M, Villari P, Zarrilli RJ. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Antimicrob Chemother.* 2006;57(5):979-82.
2. Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Mahrez K. Involvement of SHV-12 and SHV-2a encoding plasmids in outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *Microb Drug Resist.* 2004;10(2):132-8.
3. Bisson G, Fishman NO, Patel JB, Edelstein PH, Lautenbach E. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002;23:254-260.
4. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1-14.
5. Boo NY, Ng SF, Lim VK. A case-control study of risk factors associated with rectal colonization of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* sp. in newborn infants. *J Hosp Infect.* 2005;61(1):68-74.
6. Boszczowski I, Nicoletti C, Puccini DM, Pinheiro M, Soares RE, Van der Heijden IM, Costa SF, Barone AA, Levin AS. Outbreak of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* infection in a neonatal intensive care

unit related to onychomycosis in a health care worker. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:648-650.

7. Branger C, Bruneau B, Lesimple AL, Bouvet PJ, Berry P, Sevali-Garcia J, Lambert-Zechovsky N. Epidemiological typing of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates responsible for five outbreaks in a university hospital. *J Hosp Infect*. 1997;36(1):23-36.

8. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr*. 1978;93(1):120-2.

9. Cassettari VC, Silveira IR, Balsamo AC, Franco F. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82(4):313-6.

10. CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2004) CDC PulseNet National Molecular Subtyping Network for Foodborne and Disease Surveillance. One Day Standardized Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Atlanta (GA).

11. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19, Pennsylvania, USA, 2009

12. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*. 2008;13(47):1-11.



13. Corso A, Ceriana P, Guerriero L, Callejo R, Prieto M, Tuduri E, Lopardo H, Vay C, Smayevsky J, Tokumoto M, Dominguez H, Guerreiro B, Adé MP, Galas M. Control de calidad en bacteriología y resistencia a los antimicrobianos: siete años de experiencia en América Latina. *Rev Panam Infectol* 2008;10 (4 Supl 1):S26-37.
14. Crivaro V, Bagattini M, Salza MF, Raimondi F, Rossano F, Triassi M, Zarrilli R. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2007;67(2):135-41.
15. de Almeida VC, Pessoa-Silva CL, Sampaio JL, Gontijo Filho PP, Teixeira LM, Moreira BM. Genetic relatedness among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak isolates associated with colonization and invasive disease in a neonatal intensive care unit. *Microb Drug Resist.* 2005;11(1):21-5.
16. Desimoni MC, Esquivel GP, Merino LA. Colonización fecal por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido em una unidad neonatal de cuidados intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(9):507-11.
17. Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Churchill Livingstone, 2005. p.2567-81.
18. Gaillot O, Maruejols C, Abachin E, Lucuru F, Arlet G, Simonet M, Berche P. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-

spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1357-1360.

19. Garcia DO, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, Padoveze MC, Freire MP, Silveira FP, Paterson DL. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1790-3.

20. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control.* 1988;16(3):128-40.

21. Gastmeier P, Groneberg K, Weist K, Ruden H. A cluster of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in a neonatal intensive care department: identification of transmission and intervention. *Am J Infect Control.* 2003;31:424-430.

22. Gupta A, Della-Latta P, Todd B, San Gabriel P., Haas J., Wu F., Rubenstein D., Saiman L. Outbreak of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25:210-215.

23. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to

the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008 Nov;29(11):996-1011.

24. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983;11(6):315-7.

25. Mammina C, Di Carlo P, Cipolla D, Giuffrè M, Casuccio A, Di Gaetano V, Plano MR, D'Angelo E, Titone L, Corsello G. Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. *Am J Infect Control.* 2007;35(4):222-30.

26. Martins-Loureiro M, de Moraes BA, de Mendonça VL, Rocha-Quadra MR, dos Santos-Pinheiro G, Dutra-Asensi M. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Latinoam Microbiol.* 2001;43(2):88-95.

27. Mosqueda-Gómez JL, Montañó-Loza A, Rolón AL, Cervantes C, Bobadilla-del-Valle JM, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U, Villasís-Keever A, Galindo-Fraga A, Palacios GM, Ponce-de-León A, Sifuentes-Osornio J. Molecular epidemiology and risk factors of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. A case-control study. *Int J Infect Dis.* 2008;12(6):653-9.

28. Otman J, Cavassin ED, Perugini ME, Vidotto MC. An outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002 Jan;23(1):8-9.
29. Parsons MB, Cooper KL, Kubota KA, Puhr N, Simington S, Calimlim PS, Schoonmaker-Bopp D, Bopp C, Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ribot EM. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Foodborne Pathog Dis*. 2007;4:285-292.
30. Paterson DL, Bonomo RL. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:657-686.
31. Patterson JE, Hardin TC, Kelly CA, Garcia RC, Jorgensen JH. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000;21:455-458.
32. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006;118(2):511-21.
33. Pessoa-Silva CL, Meurer Moreira B, Câmara Almeida V, Flannery B, Almeida Lins MC, Mello Sampaio JL, Martins Teixeira L, Vaz Miranda LE, Riley LW, Gerberding JL. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. *J Hosp Infect*. 2003;53(3):198-206.

34. Pessoa-Silva CL, Richtmann R, Calil R, Santos RM, Costa ML, Frota AC, Wey SB. Healthcare-associated infections among neonates in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25(9):772-7.
35. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:589-603.
36. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl 1):75-81.
37. Rahal JJ, Urban C, Horn D, Freeman K, Segal-Maurer S, Maurer J, Mariano N, Marks S, Burns JM, Dominick D, Lim M. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *J Am Med Assoc.* 1998;280:1233-1237.
38. Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S, Biedenbach DJ; SENTRY Participants Group (Latin America). Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002;44(3):273-80.
39. Shlaes DM, Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, Eckman MR, Farrer WE, Greene WH, Lorian V, Levy S, McGowan JE Jr, Paul SM, Ruskin J, Tenover FC, Watanakunakorn C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of

antimicrobial resistance in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(4):275-91.

40. Sirot D, De Champs C, Chanal C, Labia R, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Sirot J. Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum beta-lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(8):1576-81.

41. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-2239.

42. Then RL, Glauser MP, Angehrn P, Arisawa M. Cephalosporin resistance in strains of *Klebsiella oxytoca* isolated during antibiotic therapy. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* 1983;254(4):469-79.

## **Anexo I: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa**



São Paulo, 6 de dezembro de 2008.

*Il<sup>mo(a)</sup>. S<sup>r(a)</sup>.*

**Valéria Cassettari Chiaratto**

Divisão de Clínica Médica

Hospital Universitário

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Fatores de risco para colonização de recém-nascidos durante surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido em unidade neonatal de risco intermediário” – **Co-autor(res)**: Isa Rodrigues da Silveira Cabral de Menezes, Nilton Lincopan, Milena Dropa, Elsa Masae Mamizuka, Paulo Rossi Menezes - **Registro CEP-HU/USP**: 847/08 – **SISNEP CAAE**: 0059.0.198.000-08

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 5 de dezembro de 2008, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2.c.

**O primeiro relatório está previsto para 5 de dezembro de 2009.**

Atenciosamente,

**Dr. Maurício Seckler**  
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**  
**Hospital Universitário da USP**



**Anexo II: Artigo publicado**



# Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit

V.C. Cassettari<sup>a,\*</sup>, I.R. da Silveira<sup>a</sup>, M. Dropa<sup>b</sup>, N. Lincopan<sup>c,d</sup>,  
E.M. Mamizuka<sup>c</sup>, M.H. Matté<sup>b</sup>, G.R. Matté<sup>b</sup>, P.R. Menezes<sup>e,f</sup>

<sup>a</sup> Hospital Infection Control Committee, Hospital Universitário, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> School of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Division of Epidemiology, Hospital Universitário, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>f</sup> Department of Preventive Medicine, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 4 June 2007; accepted 14 November 2008

Available online 14 January 2009

## KEYWORDS

Extended-spectrum  
 $\beta$ -lactamase;  
Neonatology;  
Outbreak; Risk factors

**Summary** We describe a cross-sectional survey to identify risk factors for colonisation of neonates by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. This occurred following exposure to a colonised healthcare worker during an outbreak in an intermediate-risk neonatal unit. In total, 120 neonates admitted consecutively during a three-month period were screened for ESBL-producing *K. pneumoniae* by rectal swabbing and 27 were identified as colonised. Multivariate analysis showed colonisation to be independently associated with use of antibiotics and absence of breastfeeding. Previous use of antibiotics presented an odds ratio (OR) of 12.3 [95% confidence interval (CI): 3.66–41.2,  $P < 0.001$ ]. The most commonly used antibiotics were penicillin and amikacin. Breastfeeding was associated with reduced risk for colonisation (OR: 0.22; 95% CI: 0.05–0.99;  $P = 0.049$ ). Nine isolates recovered during the first stage of the outbreak and 27 isolates from surveillance cultures were typed thereafter by pulsed-field gel electrophoresis, revealing six different profiles (A–F). Clones A, C, and E were implicated in the first stage of the outbreak, whereas among the 27 strains

\* Corresponding author. Address: Av. Prof. Lineu Prestes 2565 - 3º andar - CCIH, São Paulo-SP, CEP 05508-000, Brazil. Tel.: +55 11 30919242; fax: +55 11 30919240.

E-mail address: [valeriac@hu.usp.br](mailto:valeriac@hu.usp.br)

recovered from surveillance cultures, all six clones were identified. Clone A was also found on the hand of a nursing auxiliary with onychomycosis. We concluded that prior antimicrobial use predisposed to colonisation. The possible role of breastfeeding as a protective factor needs to be further elucidated. Detection of different genotypes of ESBL-producing *K. pneumoniae* suggests that dissemination of mobile genetic elements bearing the ESBL gene may have been superimposed on the simple dissemination of a clone during the outbreak.

© 2008 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Since *K. pneumoniae* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) was first isolated in Germany in 1983, many outbreaks have been reported worldwide.<sup>1</sup> In Brazil, the situation has become more alarming after the description of *K. pneumoniae* simultaneously expressing both metallo- $\beta$ -lactamase and ESBL enzymes, rendering such strains resistant to all available  $\beta$ -lactams.<sup>2,3</sup> The association between outbreaks of ESBL-producing enterobacteria and the use of third-generation cephalosporins has often been reported.<sup>4,5</sup> Health-care workers may act as a vehicle in the transmission between patients, and the major reservoir is the intestinal tract of colonised individuals, but situations in which there was a common source of dissemination have also been described.<sup>6–10</sup>

To date, the majority of published studies has been carried out in intensive care units.<sup>6,9–11</sup> Most previous studies have focused on factors associated with the risk of infection by such organisms; little information is available on factors associated with the risk of colonisation, which might help to decide on measures to prevent the dissemination of such strains in the hospital setting. The aims of the present study were to describe an outbreak of *K. pneumoniae* in a neonatal unit of a general hospital, to investigate factors associated with risk of colonisation by such bacteria, and to analyse the genetic relationship of the strains identified.

## Methods

The study was carried out in the intermediate-risk neonatal unit (IRNU) of the University Hospital, São Paulo, Brazil. This unit has 17 beds, a mean turnover of 450 patient-days/month, and provides care for neonates who suffer from diseases such as neonatal jaundice, respiratory distress syndrome, or vertically transmitted infection, but who have

not undergone invasive procedures. The hospital also has a neonatal intensive care unit, to which more critical cases are sent, and from where patients can return to the IRNU.

## Description of the outbreak

Between August and November 2004, there was an outbreak of ESBL-producing *K. pneumoniae* in the IRNU, involving seven infections (three bloodstream infections, two urinary tract infections and two cases of conjunctivitis) and two cases of colonisation. The infection was thought to be a contributory factor in the death of one of the patients with bloodstream infection.

The staff was notified of the outbreak, and to limit the spread of the organism, contact precautions and the introduction of alcohol gel for hand hygiene were introduced, and infection control standards enforced. The use of antimicrobial agents, especially third-generation cephalosporins, was restricted. Previously cleaned oxygen tents, weighing machines, furniture, baths and surfaces used for nappy changing were cleaned with 70% alcohol. Thermometers and stethoscopes were already single-patient use, and staff were advised not to share moisturising creams between patients.

The investigation included identification of possible common risk factors and invasive procedures among affected patients. The content and packaging of hospital products were examined for flaws, and the way they were handled reviewed. Moisturising creams were sent for microbiological culture. Despite these measures, the emergence of new cases persisted.

Between November 2004 and February 2005, all patients admitted to that unit were screened for gut colonisation with weekly rectal swabs. During that period, there were no new cases of infection, but 27 new cases of colonisation were identified among 120 patients. In January 2005, the hands of 48 healthcare professionals who worked in the unit

were inspected, and superficial swabs were collected from hands of nine who presented with dermatological lesions. On 1 February 2005, a healthcare worker with a small, dry onychomycotic lesion was found to have a positive superficial culture for ESBL-producing *K. pneumoniae*. She was removed from direct contact with patients for one week, during which time she received oral and topical ciprofloxacin and oral fluconazole to treat the underlying candidiasis.

One week later the healthcare worker had a negative surveillance culture from her hands for ESBL-producing *K. pneumoniae*, and returned

to her usual duties. It was not considered necessary to investigate her for intestinal carriage. Surveillance cultures continued to be collected from patients for a further four weeks, after which no more colonised patients were detected, and routine surveillance cultures discontinued.

One month later, rectal swabs were collected on all patients in the unit for the last time, and were all negative. There have been no new cases of either infection or colonisation by ESBL-producing *K. pneumoniae* in this neonatal unit since then.

**Table 1** Crude and adjusted (for previous antibiotic use) bivariate analysis of the neonatal risk factors for acquisition of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*

Risk factor	All babies		Univariate association		Previous antibiotic use		No previous antibiotic use		Adjusted association	
	Total	No. (%) colonised	OR (95% CI)	<i>P</i>	Total	No. (%) colonised	Total	No. (%) colonised	OR (95% CI)	<i>P</i>
Previous antibiotic use										
No	64	4 (6)	1							
Yes	56	23 (41)	10.45 (3.14–44.2)	<0.001						
Sex										
Male	53	8 (15)	1		22	8 (36)	31	0 –	1	
Female	67	19 (28)	2.23 (0.89–5.59)	0.088	34	15 (44)	33	4 (12)	2.09 (0.77–5.68)	0.149
Type of delivery										
Vaginal	77	13 (17)	1		31	11 (35)	46	2 (4)	1	
Caesarean	43	14 (33)	2.38 (0.99–5.69)	0.052	25	12 (48)	18	2 (11)	1.87 (0.77–4.86)	0.201
Birthweight (g)										
>2500	91	17 (19)	1		39	15 (38)	52	2 (4)	1	
≤2500	29	10 (34)	2.29 (0.90–5.80)	0.080	17	8 (47)	12	2 (17)	1.89 (0.68–5.28)	0.224
Prematurity										
No	83	15 (18)	1		36	13 (36)	47	2 (4)	1	
Yes	37	12 (32)	2.18 (0.90–5.28)	0.086	20	10 (50)	17	2 (12)	1.99 (0.75–5.32)	0.168
Breastfeeding										
No	12	5 (42)	1		5	5 (100)	7	0 –	1	
Yes	108	22 (20)	0.36 (0.10–1.24)	0.104	51	18 (35)	57	4 (7)	0.22 (0.05–0.99)	0.049
Length of stay (days)										
≤3	34	3 (9)	1		3	0 –	31	3 (10)	1	
4–10	63	13 (21)	2.69 (0.71–10.19)		32	13 (41)	31	0 –	0.96 (0.20–4.63)	
≥11	23	11 (48)	9.47 (2.24–40.0)	<0.001 <sup>a</sup>	21	10 (48)	2	1 (50)	1.89 (0.32–11.03)	0.310*
Previous ICU stay										
No	84	13 (15)	1		31	10 (32)	53	3 (6)	1	
Yes	36	14 (39)	3.47 (1.42–8.49)	0.006	25	13 (52)	11	1 (9)	2.15 (0.81–5.71)	0.125

OR, odds ratio; CI, confidence interval; ICU, intensive care unit.

<sup>a</sup>  $\chi^2$ -Test for linear tendency.

## Microbiological and genetic analysis

Identification and antimicrobial susceptibility testing of isolates were performed using a Vitek system (BioMérieux, Hazelwood, MO, USA). ESBL-producing strains were screened by the double-disc synergy test, and DNA fingerprinting was carried out by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).<sup>12</sup> Band polymorphism generated by PFGE was analysed using the GelWorks 1D Advanced and GelWorks 1D Database software (UVP Bioimaging Systems, Upland, CA, USA), and the PFGE patterns were grouped according to Dice similarity coefficient.

## Cross-sectional survey

All patients admitted to the IRNU between November 2004 and January 2005 had been exposed to contact with the colonised healthcare worker. We carried out a cross-sectional survey to investigate potential risk factors after this exposure associated with the acquisition of the agent by the 120 neonates who had been screened. Patients' charts were also reviewed for potential risk factors.

## Statistical analysis

All the variables analysed were grouped into categorical values. Bivariate analysis was carried out to obtain crude estimates of the association between potential risk factors and risk of colonisation by *K. pneumoniae*. Statistical associations were examined with  $\chi^2$ -tests, or the  $\chi^2$ -test for linear trend, when variables had three or more ordered categories. The strength of the associations was examined by calculating odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CIs). Multivariate analysis was carried out using stepwise multiple logistic regression to examine which factors were independently associated with risk of colonisation. Variables with  $P < 0.25$  in the bivariate analysis were selected for the multivariate analysis. Variables were kept in the final multivariate model if they had  $P < 0.05$ . All statistical analyses were performed using STATA 9.0 (StataCorp, College Station, TX, USA).

## Results

### Cross-sectional survey

Of the 120 newborn infants included in the study, 27 (22.5%) were colonised. The bivariate analysis suggested that type of delivery, birthweight,

previous antibiotic use, length of stay and previous admission to the intensive care unit were significantly associated with colonisation ( $P < 0.05$ ; Table I).

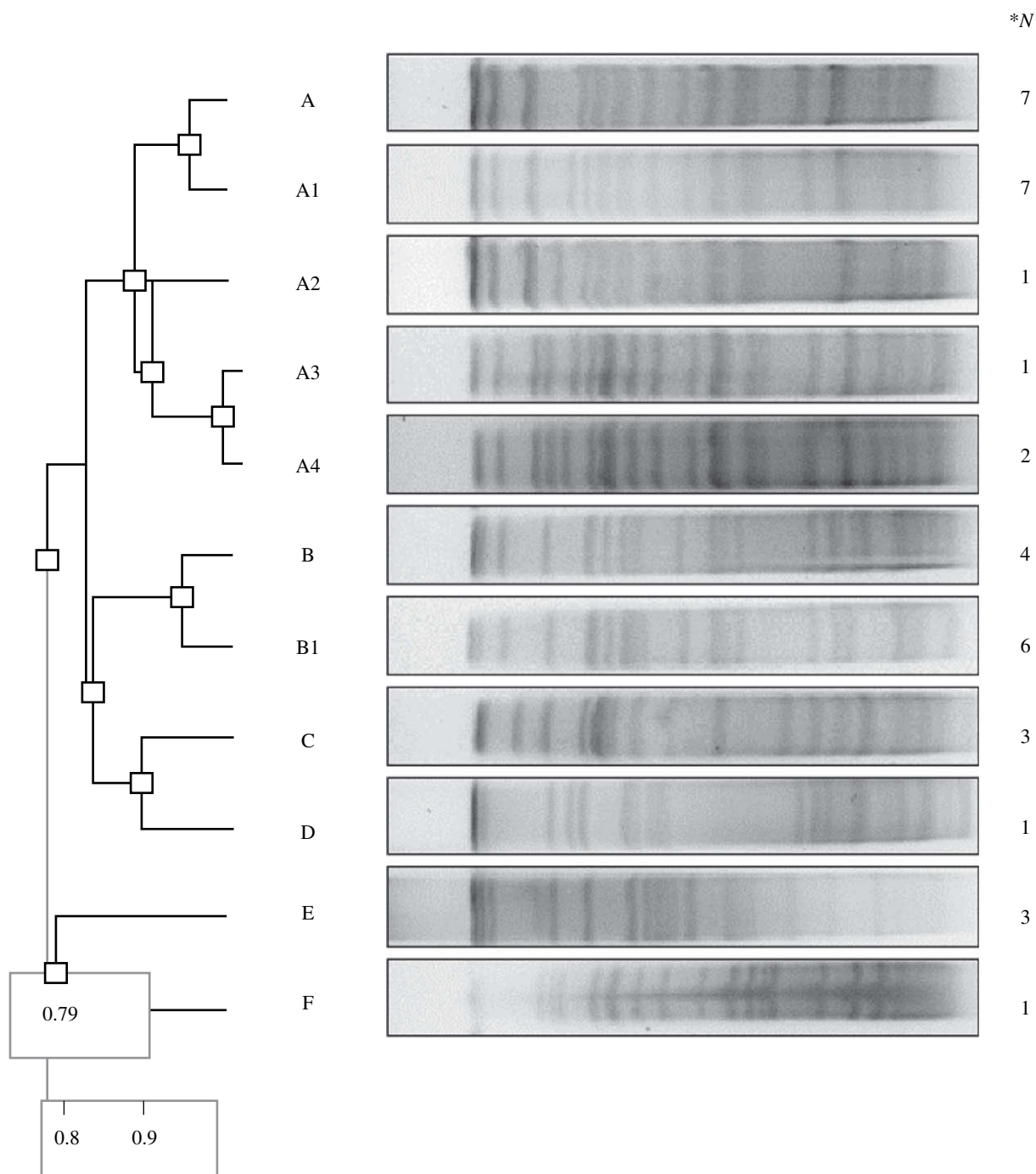
All the variables analysed in the bivariate analysis were associated with risk of colonisation ( $P < 0.25$ ), and were therefore examined in the multiple logistic regression analysis. Only use of antibiotics and breastfeeding prior to swabbing remained as factors independently associated with colonisation in the multivariate analysis. The OR of antibiotic use adjusted for breastfeeding was 12.3 (95% CI: 3.66–41.2;  $P < 0.001$ ). The OR of breastfeeding adjusted for antibiotic use was 0.22 (95% CI: 0.47–0.99;  $P = 0.049$ ). The most commonly used antibiotics among both colonised and non-colonised patients were penicillin and amikacin (Table II).

## Microbiological and genetic analysis

Between August 2004 and January 2005, a total of 37 strains of *K. pneumoniae* were recovered from seven infected and 29 colonised newborn patients, and from one healthcare worker. All strains displayed the ESBL phenotype, with resistance to penicillins and cephalosporins and susceptibility to carbapenems and fluoroquinolones. Six main types (A–F) were identified by PFGE, according to the method of Tenover *et al.*<sup>13</sup> Five subtypes (A1–A4 and B1) were identified according to Dice similarity coefficient (Figure 1). The PFGE patterns A ( $N = 7$ ), C ( $N = 1$ ) and F ( $N = 1$ ) were implicated in the first stage of the outbreak, whereas PFGE pattern B was commonly found in the surveillance culture-recovered isolates (Figure 2). Strains showing

**Table II** Antibiotics used before specimen collection

	Colonised ( $N = 27$ )	Non-colonised ( $N = 93$ )
	No. (%)	No. (%)
Amikacin	21 (91)	26 (28)
Penicillin	20 (87)	27 (29)
Cefotaxime	4 (17)	7 (8)
Ampicillin	3 (13)	8 (9)
Oxacillin	2 (9)	2 (2)
Vancomycin	2 (9)	2 (2)
Imipenem	1 (4)	1 (1)
Meropenem	0	1 (1)
Fluconazole	1 (4)	0
Amphotericin B	0	1 (1)

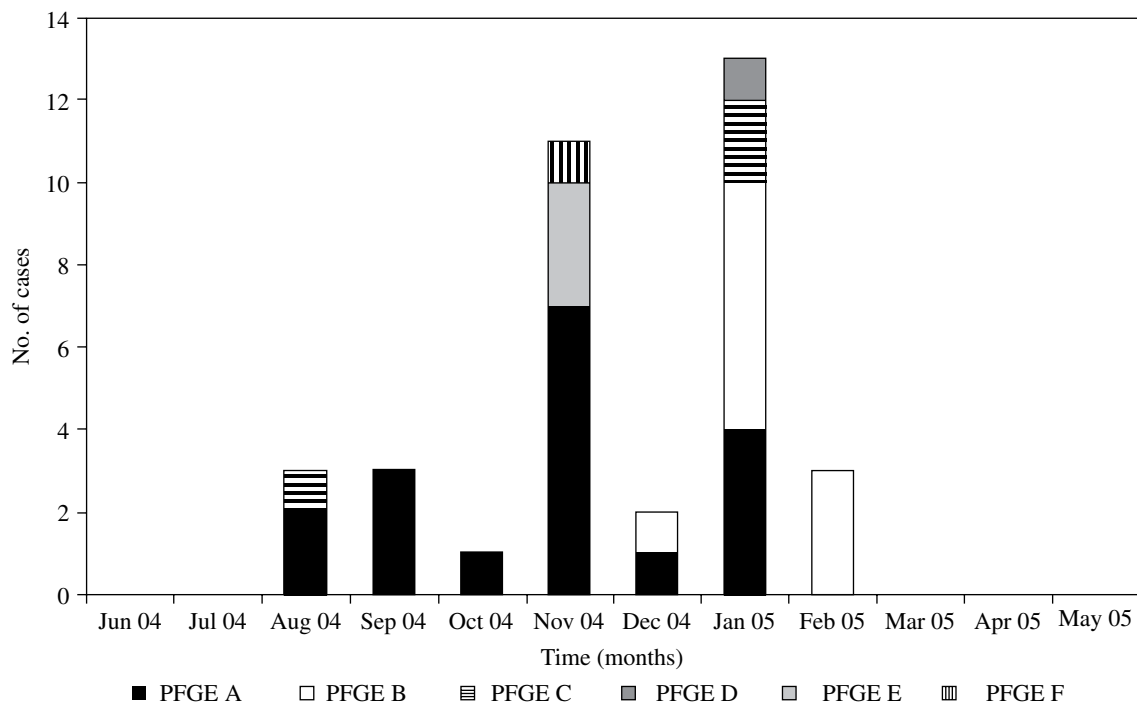


**Figure 1** Estimates of genetic relationship, according to Dice similarity coefficient, of the *Xba*I patterns of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *K. pneumoniae* strains isolated from neonates and from the hand of a health-care worker. \*N = number of strains exhibiting a particular pulsed-field gel electrophoresis pattern.

the PFGE-A pattern were the most frequently isolated ( $N = 19$ ), being recovered from clinical and surveillance samples, including from the health-care worker. Table III summarises the PFGE and antimicrobial resistance profiles for 18 ESBL-producing *K. pneumoniae* recovered in the first stage of the outbreak.

## Discussion

This study is unusual in that the patients involved in the outbreak were not in the intensive care unit. We suspected that the outbreak was related to a healthcare worker with onychomycosis colonised with ESBL-producing *K. pneumoniae*, since she was



**Figure 2** New cases of infection and colonisation by extended-spectrum β-lactamase-producing *K. pneumoniae* in the intermediate-risk neonatal unit during the study period. PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

in close contact with all newborn infants hospitalised in the IRNU. Moreover, the outbreak was controlled after she was removed from direct patient contact and received treatment.

Unlike other studies investigating risk factors for the acquisition of ESBL-producing *K. pneumoniae*, the use of third-generation cephalosporins was apparently not a contributing factor for the persistence of the outbreak.<sup>4,5,14</sup> However, the use of less stringently controlled antibiotics, such as penicillin and amikacin, was significantly associated

with ESBL-producing *K. pneumoniae* colonisation. Thus, rational use of all antibiotics should be reinforced, as even non-broad-spectrum agents can support host colonisation by multidrug-resistant organisms.

Breastfeeding was found to be associated with a lower risk of acquisition of ESBL-producing *K. pneumoniae*. Breastfed neonates have more contact with their mothers and it is possible that they are handled less frequently by healthcare workers. Unfortunately, we were not able to

**Table III** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing and resistance profiles for 22 extended-spectrum β-lactamase-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae*

PFGE profile	No. of isolates tested	Resistance phenotypes <sup>a</sup>
A	2	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, TIM
A	1	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, TIM, AMK, GEN
A	3	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, PTZ, TIM, AMK, GEN
A1	4	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, TIM, AMK, GEN
A3	1	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, TIM, AMK, GEN
A4	2	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, PTZ, TIM, AMK, GEN
B	4	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, TIM, GEN
C	1	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, TIM, GEN, SXT
E	3	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, PTZ, TIM, GEN
F	1	ATM, CTX, CAZ, FEP, SAM, TIM, AMK, GEN

ATM, aztreonam; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; SAM, ampicillin/sulbactam; TIM, ticarcillin/clavulanic acid; PTZ, piperacillin/tazobactam; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; SXT, sulphamethoxazole/trimethoprim.

<sup>a</sup> Determined by the Vitek system (BioMérieux, Hazelwood, MO, USA).



measure this. Furthermore, the number of non-breastfed neonates was small. Nevertheless, this protective effect has been previously reported; after discharge from hospital, bottle-fed newborns showed higher rates of colonisation by similar strains.<sup>8</sup> The role of breastfeeding merits further evaluation, since the gut colonisation of hospitalised newborns seems to be affected by multiple factors.<sup>15</sup>

Although the PFGE type A that had also been isolated from the healthcare worker predominated in the early phase of the outbreak, the detection of different genotypes of ESBL-producing *K. pneumoniae* among infected and colonised patients suggests that outbreaks due to ESBL-producing bacteria may occur through the rapid dissemination of mobile genetic elements bearing the ESBL genes more than by the dissemination of one particular clone.

The harbouring of similar plasmids by distinct *K. pneumoniae* clones, and even by different Enterobacteriaceae, isolated from clinical specimens during outbreaks has already been described.<sup>16,17</sup>

To our knowledge, this is the second published description of an ESBL-producing *K. pneumoniae* outbreak related to onychomycosis in a healthcare worker, which raises the possibility of a relationship between this species and *Candida* species.<sup>9,18</sup>

The main limitation encountered in this study was the relatively small sample size, which yielded wide confidence interval estimates, and may have led to type II errors in the statistical analysis. Another limitation was the absence of molecular techniques for ESBL characterisation; it would have been interesting to explore the possibility of the dissemination of a common mobile genetic element among strains from affected patients and the healthcare worker. It is also possible that some of the strains could have been imported from the neonatal intensive care unit.

## Acknowledgements

We are grateful to the staff from the Clinical Laboratory Service of the Hospital Universitário for their support.

### Conflict of interest statement

None declared.

### Funding sources

This work was partly funded by grants from CNPq, CECOISA and FAPESP. P.R.M. was partly funded by CNPq-Brazil.

## References

1. Paterson DL, Bonomo RL. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;**18**: 657–686.
2. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:516–519.
3. Lincopan N, Leis R, Vianello MA, Elmor de Araujo MR, Ruiz AS, Mamizuka EM. Enterobacteria producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamases isolated from Brazilian hospitals. *J Med Microbiol* 2006;**55**:1611–1613.
4. Rahal JJ, Urban C, Horn D, *et al.* Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *J Am Med Assoc* 1998;**280**:1233–1237.
5. Patterson JE, Hardin TC, Kelly CA, Garcia RC, Jorgensen JH. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;**21**:455–458.
6. Gupta A, Della-Latta P, Todd B, *et al.* Outbreak of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;**25**: 210–215.
7. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;**11**: 589–603.
8. Duman M, Abacioglu H, Karaman M, Duman N, Ozkan H. Beta-lactam antibiotic resistance in aerobic commensal fecal flora of newborns. *Pediatr Int* 2005;**47**:267–273.
9. Boszczowski I, Nicoletti C, Puccini DMT, *et al.* Outbreak of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* infection in a neonatal intensive care unit related to onychomycosis in a health care worker. *Pediatr Infect Dis J* 2005;**24**:648–650.
10. Gaillot O, Maruejols C, Abachin E, *et al.* Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:1357–1360.
11. Gastmeier P, Groneberg K, Weist K, Ruden H. A cluster of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in a neonatal intensive care department: identification of transmission and intervention. *Am J Infect Control* 2003;**31**:424–430.
12. Parsons MB, Cooper KL, Kubota KA, *et al.* PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Foodborne Pathog Dis* 2007;**4**:285–292.
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;**33**:2233–2239.
14. Bisson G, Fishman NO, Patel JB, Edelstein PH, Lautenbach E. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;**23**:254–260.
15. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003;**91**:48–55.



16. Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, *et al.* Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006;**57**:979–982.
17. Crivaro V, Bagattini M, Salza MF, *et al.* Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2007;**67**:135–141.
18. Hermann C, Hermann J, Munzel U, Ruchel R. Bacterial flora accompanying *Candida* yeasts in clinical specimens. *Mycoses* 1999;**42**:619–627.