

BACILOS GRAM NEGATIVOS PRODUTORES DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO EXPANDIDO Num Hospital Pediátrico

Andrea DIAS, Guiomar OLIVEIRA, Henrique OLIVEIRA,
Margarida MARQUES, Fernanda RODRIGUES

RESUMO

Introdução: As *Enterobacteriaceae* são causa frequente de doença invasiva na criança. A produção de β -lactamases de espectro expandido (ESBL) por estas bactérias, com consequente aumento da resistência aos antibióticos tem-se revelado um problema crescente. Os dados pediátricos são escassos.

Objectivos: Identificar as crianças com infecção por bacilos produtores de ESBL, determinando a prevalência em infecção associada aos cuidados de saúde e adquirida na comunidade. Analisar dados demográficos, clínicos, laboratoriais, terapêuticos e de evolução. Determinar possíveis factores de risco para infecção por estes germens.

Metodologia: Estudo caso-controlo, efectuado num hospital pediátrico nível III, entre Julho de 2007 e Dezembro de 2009. Os doentes foram identificados a partir da base de dados do Serviço de Microbiologia. Crianças com infecção por bacilos produtores de ESBL foram comparadas com um grupo com infecção por bacilos gram negativos não produtores de ESBL, seleccionados de forma sistemática, atendendo ao germen, local de isolamento e data da colheita. Para a análise estatística foi usado o programa SPSS® 17.1.

Resultados: O fenótipo produtor de ESBL foi detectado em 0,5% das *Escherichia coli* e 16,4% das *Klebsiella* spp identificadas, com isolamento destes germens em 23 crianças: 7 *Escherichia coli* (30,4%), 15 *Klebsiella pneumoniae* (65,2%) e 1 *Klebsiella oxytoca* (4,3%). O principal diagnóstico foi infecção urinária (39%). Necessitaram de admissão hospitalar 70% dos casos versus 50% dos controlos ($p=0,141$), com duração média de internamento de 69 dias para os casos e 36 dias para os controlos ($p=0,235$). O intervalo médio entre admissão e infecção foi 32 dias nos dois grupos ($p=0,978$). A identificação de germens produtores de ESBL ocorreu em infecções associadas aos cuidados de saúde em 70% dos casos (25% nos controlos, $p=0,001$). Casos de infecção na comunidade ocorreram sobretudo no último ano ($n=4$). Presença de doença crónica ($p=0,022$), internamento ($p=0,025$), antibioterapia ($p=0,008$) e ventilação invasiva ($p=0,002$) prévios, foram mais frequentes nas infecções por germens produtores de ESBL. Cirurgia ($p=0,175$) e presença de cateter venoso central ($p=0,189$) não constituíram factores de risco. Em análise multivariada, apenas ventilação invasiva prévia constituiu um factor de risco independente para infecção por germens produtores de ESBL ($p=0,002$; OR=7).

Conclusões: O fenótipo produtor de ESBL foi detectado em 0,5% das *Escherichia coli* e 16,4% das *Klebsiella* spp, maioritariamente em infecções associadas aos cuidados de saúde. Presença de doença crónica, internamento, uso prévio de antibióticos e ventilação invasiva foram mais frequentes nas infecções por estes germens, no entanto apenas a última se revelou um factor de risco independente.

A.D., F.R.: Unidade de Infeciologia. Hospital Pediátrico de Coimbra. Coimbra. Portugal
G.O.: Centro do Desenvolvimento. Hospital Pediátrico de Coimbra. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Coimbra. Portugal
H.O.: Laboratório de Microbiologia. Serviço de Patologia Clínica. Centro Hospitalar de Coimbra. Coimbra. Portugal
M.M.: Departamento de Biofísica e Biomatemática. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Coimbra. Portugal

SUMMARY

EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE PRODUCING BACILLI IN A PAEDIATRIC HOSPITAL

Background: *Enterobacteriaceae* are a common cause of invasive disease in children. The production of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) by these bacteria and consequent resistance to several antibiotics has increased. The paediatric data are scarce.

Aims: To identify children infected with ESBL-producing bacilli, determining their prevalence in health care related infection and community-acquired disease. To analyse demographic, clinical, laboratory, therapeutic and follow-up data. To identify potential risk factors for infection by ESBL-producing organisms.

Methodology: A case-control study, conducted in a level III paediatric hospital, from July 2007 to December 2009. All patients were identified from the microbiology database. Children infected by ESBL-producing bacilli were compared with a group with infection by non-ESBL producers, selected in a systematic way, given the bacteria, product and date of isolation. Statistical data analysis was performed using SPSS® 17.1.

Results: The ESBL-producing phenotype was detected in 0.5% of *Escherichia coli* and 16.4% of *Klebsiella* spp identified. These bacteria were isolated in 23 children: 7 *Escherichia coli* (30.4%), 15 *Klebsiella pneumoniae* (65.2%) and 1 *Klebsiella oxytoca* (4.3%). The most common diagnosis was urinary tract infection (39%). Hospital admission was required in 70% of the cases versus 50% controls ($p=0.141$), with mean duration stay of 69 days for cases and 36 days for controls ($p=0.235$). The mean time between admission and infection was 32 days in both ($p=0.978$). Health care related infections were identified in 70% of cases versus 25% of controls ($p=0.001$). Infections due to ESBL-producing organisms occurred in the community setting particularly in the last year of the study ($n=4$). The presence of chronic disease ($p=0.022$) and previous hospitalization ($p=0.025$), antibiotic use ($p=0.008$) and invasive ventilation ($p=0.002$) were more common in infection caused by ESBL-producing bacteria. Surgery ($p=0.175$) and the presence of a central venous catheter ($p=0.189$) were not risk factors. In a multivariate analysis, only prior invasive ventilation was an independent risk factor for infection by ESBL-producing bacteria ($p=0.002$, OR=7).

Conclusions: The ESBL-producing phenotype was detected in 0.5% *Escherichia coli* and 16.4% *Klebsiella* spp identified; mainly in health care related infections. The presence of chronic disease and previous hospitalization, invasive ventilation and antibiotic intake were more common in infections caused by these bacteria. Prior invasive ventilation was an independent risk factor.

INTRODUÇÃO

Os bacilos gram negativos são causa frequente de doença grave na criança. Após o uso generalizado de vacinas contra alguns dos principais germens causadores de doença invasiva, nomeadamente as vacinas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b e *Streptococcus pneumoniae*, tem-se assistido, em alguns centros, a um aumento do isolamento de germens gram negativos ¹.

A produção de β -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência destas bactérias aos antibióticos β -lactâmicos. No sentido de ultrapassar esta resistência têm sido usadas associações antibióticas de β -lactâmico e inibidor das β -lactamases, bem como antibióticos de espectro mais amplo, como as cefalosporinas de 3ª geração ². Assistimos contudo, em paralelo, a uma emergência de resistências a estes antibióticos sendo uma das razões a produção de β -lactamases de espectro expandido (ESBL). Estas enzimas, mediadas por plasmídeo, são capazes de conferir resistência às

penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª geração e ao aztreonam, mas não às cefamicinas (cefotaxima e cefotetan) e carbapenemos (meropenem, imipenem, ertapenem), sendo inibidas *in vitro* pelos inibidores das β -lactamases, tais como ácido clavulânico e tazobactam ³. As ESBL foram descritas pela primeira vez em 1983, na Alemanha, em estirpes de *Escherichia coli*, seguindo-se a sua detecção em *Klebsiella pneumoniae* e posteriormente noutros bacilos gram negativos como *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp e outras *Enterobacteriaceae* ⁴. Dados do Eurosurveillance, referentes ao triénio 2004-2006, mostravam que 10 a 30% de todas as *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* eram produtoras de ESBL nalguns países europeus ⁵, atingindo os 44% nos Estados Unidos, Canadá e América Latina, sobretudo entre *Klebsiella pneumoniae* ^{6,7}. Tem-se também revelado crescente a importância destes germens nas infecções da comunidade. Em França, em 1993, não foram detectados casos na comunidade, no entanto entre 2004-2006 foram isolados em situações de gastroenterite e infecção urinária

⁴. Apesar da escassez de dados, este fenómeno tem sido também referido na população pediátrica, no mesmo tipo de infecções ⁸.

Um dos factores que tem sido apontado com responsável pelo aumento da frequência de infecção por germens produtores de ESBL é o uso generalizado de alguns antibióticos de largo espectro, nomeadamente cefalosporinas de 3ª geração, quinolonas, cotrimoxazol, aminoglicosídeos e metronidazol ⁹. A colonização fecal com bacilos produtores de ESBL facilita a sua disseminação⁴.

Como factores de risco para infecção por estes microrganismos são referidos: doença grave, internamento prolongado, procedimentos invasivos, cirurgia recente, técnicas dialíticas e malnutrição ⁴. Também aqui, a informação existente é proveniente sobretudo de estudos realizados na população adulta ⁹.

Dado o uso crescente e generalizado de antibióticos de largo espectro em Portugal ¹⁰ estima-se que seja elevada a prevalência destes germens no nosso país, nomeadamente em idade pediátrica, não existindo contudo dados publicados para este grupo etário. Torna-se fundamental conhecer a epidemiologia bacteriana nacional de modo a serem implementadas medidas de prevenção da disseminação destes germens.

Pretende-se com o presente estudo identificar as crianças infectadas por bacilos produtores de ESBL num hospital pediátrico, determinando a sua prevalência em infecção associada aos cuidados de saúde e adquirida na comunidade. Fazem parte também dos objectivos analisar dados demográficos, clínicos, laboratoriais, terapêuticos e de evolução e determinar possíveis factores de risco para infecção por estes germens, em crianças.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo populacional

Trata-se de um estudo caso-controlo, efectuado num

hospital pediátrico de nível III que serve uma população de 328.539 crianças e adolescentes, dos 0 aos 14 anos, da Região Centro do país (Instituto Nacional de Estatística, dados referentes ao ano de 2009; www.ine.pt). Dispõe de 87 camas de internamento (Unidade de Cuidados Intensivos, Oncologia, Transplante Hepático e Cirurgia e enfermaria de Medicina), registando-se anualmente cerca de 50.000 atendimentos no Serviço de Urgência e 2000 admissões (Serviço de Informática do Hospital Pediátrico) - dados referentes à altura da realização do estudo.

Os dados microbiológicos foram recolhidos da base de dados informática do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Coimbra. Foram identificadas todas as crianças com isolamento de bacilos gram negativos cujo fenótipo foi sistematicamente analisado para a presença de ESBL, em qualquer produto biológico, entre Julho de 2007 e Dezembro de 2009 (30 meses). A identificação do fenótipo ESBL iniciou-se na nossa instituição em Julho de 2007.

Definição de caso: todas as crianças identificadas com infecção por germens produtores de ESBL no período de estudo.

Definição de controlo: obtidos por amostragem sistemática das crianças com isolamento de *Escherichia coli* ou *Klebsiella spp* não produtores de ESBL, numa relação 1 caso/2 controlos, de acordo com as seguintes variáveis: mesma espécie do organismo infectante, mesmo local anatómico de isolamento e mesma data ou data mais próxima de isolamento.

Apenas foram incluídos no estudo doentes que cumpriam a definição de infecção do Centers of Disease Control and Prevention – CDC ¹¹, isto é, a condição manifestou-se clinicamente como doença e não como colonização, sendo esta definida como situação em que o microrganismo está presente mas não tem efeito adverso no hospedeiro. De acordo com os mesmos critérios considerou-se que uma criança assintomática pode ter infecção se o microrganismo patogénico for encontrado num fluido ou local anatómico

Tabela I: Distribuição anual das bactérias isoladas (*Escherichia coli* e *Klebsiella spp*) tendo em conta o fenótipo produtor de ESBL.

Bactéria	Ano de isolamento		
	2007*	2008	2009
<i>Escherichia coli</i>	227	481	594
<i>Escherichia coli</i> ESBL	2 (7,4%)	2 (0,4%)	3 (0,5%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	48	37
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	0 (0%)	14 (29%)	6 (16%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	10	9
<i>Klebsiella oxytoca</i> ESBL	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)

*Julho a Dezembro de 2007

que normalmente é estéril, como o líquido cefalorraquídeo ou sangue. Nos casos em que ocorreram vários episódios de identificação do gérmen, cada doente foi apenas incluído no estudo uma vez, correspondendo sempre ao primeiro episódio de infecção por esta bactéria.

Considerou-se infecção associada aos cuidados de saúde quando diagnosticada 48 horas após a admissão hospitalar ou diagnosticada antes das 48 horas após a admissão se o doente teve alta do hospital nas 2 semanas anteriores ou se foi transferido de outra unidade hospitalar¹².

Possíveis factores de risco para infecção por bacilos gram negativos produtores de β -lactamases foram avaliados através da revisão dos processos clínicos, de onde se colheram as seguintes variáveis: idade, sexo, número total de dias de internamento, número de dias de internamento até ao isolamento do gérmen, patologia crónica, intervenção cirúrgica, uso de antibióticos, ventilação invasiva e colocação de cateter venoso central nos 30 dias precedentes ao isolamento do gérmen. Comparou-se a presença de factores de risco nos casos e nos controlos.

Métodos microbiológicos

Os bacilos gram negativos foram isolados de produtos biológicos (sangue, urina, fezes, líquido peritoneal, líquido biliar) através de cultura, no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Coimbra e a identificação de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp produtoras de ESBL foi efectuada através de um sistema semi-automatizado baseado em microdiluições, MicroScan WalkAway®, da firma Siemens¹³. A sensibilidade deste método tem-se revelado baixa para outras *Enterobacteriaceae*, pelo que não foram consideradas no estudo. A identificação do gérmen e o teste de sensibilidade aos antibióticos foram efectuados de acordo com as indicações do fabricante. As concentrações inibitórias mínimas foram interpretadas de acordo com os valores de referência do Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

Análise estatística

A análise dos dados obtidos foi efectuada através do programa SPSS® 17.1. As variáveis em estudos foram comparadas por análise univariada sendo utilizados o teste de Qui-quadrado (X^2) ou o Teste Exacto de Fisher para comparação de variáveis qualitativas e o teste *t*-Student para comparação de variáveis contínuas, verificando-se a normalidade da distribuição das variáveis e a igualdade de variâncias. A análise inferencial foi efectuada para um nível de significância de 0,05, calculando-se o Odds ratio (OR) com 95% de Intervalo de Confiança (95% IC), para as variáveis em que a diferença foi estatisticamente significativa. As diferenças encontradas entre os dois grupos em análise univariada foram reavaliadas através análise multivariada, tendo sido usada regressão logística binária. No modelo de regressão apenas foram incluídas as

variáveis para as quais se obteve diferença estatisticamente significativa em análise univariada.

RESULTADOS

Durante o período de estudo, o fenótipo produtor de ESBL foi analisado em 1297 *Escherichia coli* e 128 *Klebsiella* spp, tendo sido detectado em 28 (2%) bactérias, correspondentes a 23 crianças: 7 *Escherichia coli* (0,5%) e 21 *Klebsiella* spp (16,4%). A distribuição das *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp isoladas, por ano, tendo em conta o fenótipo produtor de ESBL encontra-se descrita na Tabela 1.

Tendo em conta os diagnósticos verificaram-se 9 infecções urinárias (39,1%), 4 infecções respiratórias (17,4%), 4 infecções de ferida operatória/gastrostomia (17,4%), 3 sépsis (13%), 2 peritonites (8,7%) e 1 colangite (4,3%).

Os controlos foram obtidos por amostragem sistemática segundo os critérios já referidos, a partir do total de crianças com isolamento de *Escherichia coli* ou *Klebsiella* spp. Para 3 casos não foi possível determinar os respectivos controlos, por não cumprimento dos critérios pré-estabelecidos, pelo que foram excluídos (2 crianças com infecção respiratória e 1 criança com peritonite). O estudo incidiu deste modo sobre 20 casos e 40 controlos. Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos casos e os diagnósticos principais dos casos e dos controlos encontram-se descritos nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. Relativamente à distribuição por sexo, 60% das crianças com infecção por germens produtores de ESBL versus 45% das crianças com infecção por germens não produtores de ESBL, eram do sexo masculino, não se verificando contudo diferença estatisticamente significativa (X^2 , $p = 0,273$). As crianças com infecção devida a germens produtores de ESBL apresentavam uma média de idade inferior aos controlos, não sendo também esta diferença estatisticamente significativa (*t*-Student, $4 \pm 5,2$ anos versus $5 \pm 4,3$ anos; $p = 0,324$).

Apesar de 70% dos casos apresentarem critérios de internamento para tratamento da infecção comparativamente com 50% dos controlos, essa diferença não se revelou estatisticamente significativa (X^2 , $p = 0,141$). O mesmo foi possível constatar em relação à duração média de internamento (*t*-Student, $69 \pm 97,27$ dias para os casos versus $36 \pm 51,19$ dias para os controlos; $p = 0,235$) e ao intervalo médio entre a admissão e a ocorrência de infecção (*t*-Student, 32 dias em média em ambos os grupos; $p = 0,978$).

Comparando casos e controlos verificou-se que 70% das crianças com infecção por germens produtores de ESBL tiveram infecção associada aos cuidados de saúde, enquanto que essa condição se verificou apenas em 25% dos controlos (X^2 , $p = 0,001$; OR=7 (2-25), 95%IC).

Tabela 2: Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos casos.

Casos (n=20)	Sexo	Idade	Gérmem ESBL	Data de Identificação	Produto de isolamento	Local do Hospital
1	F	1m	<i>E. coli</i>	13-09-07	Líquido peritoneal	UCI
2	F	10a	<i>E. coli</i>	15-10-07	Urina	Urgência
3	M	19m	<i>K. pneumoniae</i>	24-03-08	Líquido biliar	Medicina
4	F	12m	<i>K. pneumoniae</i>	07-04-08	Sangue (CVC)	Medicina
5	M	1m	<i>K. pneumoniae</i>	15-04-08	Secreções respiratórias (TET)	UCI
6	M	1m	<i>K. pneumoniae</i>	16-06-08	Aspirado brônquico	UCI
7	M	14a	<i>E. coli</i>	30-06-08	Sangue	Medicina
8	F	17m	<i>K. pneumoniae</i>	07-07-08	Exsudato gastrostomia	Consulta
9	M	8a	<i>E. coli</i>	21-08-08	Urina	Consulta
10	M	6m	<i>K. oxytoca</i>	04-09-08	Sangue	UCI
11	F	3m	<i>K. pneumoniae</i>	22-09-08	Urina (Sonda vesical)	UCI
12	M	12a	<i>K. pneumoniae</i>	22-09-08	Exsudato gastrostomia	Medicina
13	M	1m	<i>K. pneumoniae</i>	23-09-08	Urina	Medicina
14	M	3a	<i>E. coli</i>	13-01-09	Urina	Neurocirurgia
15	M	11m	<i>K. pneumoniae</i>	21-07-09	Urina	Consulta
16	F	2m	<i>K. pneumoniae</i>	27-10-09	Exsudato ferida	Medicina
17	M	7a	<i>K. pneumoniae</i>	03-11-09	Exsudato ferida	Cirurgia
18	F	14a	<i>K. pneumoniae</i>	20-11-09	Urina	Consulta
19	F	1m	<i>E. coli</i>	25-11-09	Urina	Urgência
20	F	1m	<i>E. coli</i>	25-11-09	Urina	Urgência

(m= meses; a= anos; M= masculino; F= feminino; CVC= cateter venoso central; TET= tubo endotraqueal; UCI= Unidade de Cuidados Intensivos)

O diagnóstico das 6 crianças com infecção adquirida na comunidade por gérmem produtor de ESBL foi, em todas, infecção urinária, não sendo possível identificar factores de risco ou patologia de base em 3 casos. Os restantes apresentavam: transplante renal após insuficiência renal crónica na sequência de síndrome hemolítico urémico; espinha bífida; e síndrome de intestino curto. Quatro destas infecções ocorreram no último ano de estudo.

Tabela 3: Diagnósticos principais dos casos e dos controlos.

Diagnóstico principal	Casos (n=20)	Controlos (n=40)
Infecção urinária	9	18
Infecção ferida/gastrostomia	4	8
Sépsis/bacteriémia	3	6
Infecção respiratória	2	4
Colangite	1	1
Apendicite aguda com peritonite	1	2
Peritonite biliar	0	1

Relativamente à presença de eventuais factores de risco para infecção por germens produtores de ESBL, verificou-se que as crianças com identificação deste gérmem estiveram mais frequentemente sujeitas, nos 30 dias prévios a: internamento (X^2 , $p = 0,025$; OR = 3,5 (1,14-10,74), 95%IC), toma de antibióticos (X^2 , $p = 0,008$; OR=4,5(1,43-14,15),95%IC) e ventilação mecânica invasiva (X^2 , $p = 0,002$; OR = 7 (1,94-25,3), 95%IC) - Tabela 4.

Outros procedimentos invasivos, tais como cirurgia (X^2 , 45% casos versus 27,5% controlos; $p = 0,175$) e presença de cateter venoso central (X^2 , 30% casos versus 15% controlos; $p = 0,189$), nos 30 dias precedentes, apesar de mais frequentes nas crianças com infecção por germens produtores de ESBL, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Uma maior proporção de crianças com infecção por bacilos gram negativos produtores de ESBL tinha patologia crónica (X^2 , 85% dos casos versus 55% dos controlos; $p = 0,022$; OR= 4,6 (1,17-18,36), 95%IC). Das crianças com infecção por germens produtores de ESBL, apenas 3 eram previamente saudáveis e nessas o diagnóstico foi de infecção urinária. As doenças crónicas de base dos casos e dos controlos encontram-se descritas na Tabela 5.

Após análise multivariada, sendo consideradas no modelo

Tabela 4: Possíveis factores de risco para infecção por germens produtores de ESBL.

Características	Casos (n=20)	Controlos (n=40)	OR (95% IC)	P
Idade média (anos); DP	4 ± 5,2	5 ± 4,3		0,324
Sexo masculino	12	18		0,273
Infecção associada aos cuidados de saúde	14	10	7 (2-25)	0,001
Necessidade de internamento	14	20		0,141
Duração internamento (dias); DP	69 ± 97,2	36 ± 51,2		0,235
Intervalo entre admissão/infecção (dias); DP	32 ± 46,0	32 ± 31,8		0,978
Doença crónica de base	17	22	4,6 (1,17-18,36)	0,022
Internamento nos últimos 30 dias	12	12	3,5 (1,14-10,74)	0,025
Antibioterapia nos últimos 30 dias	12	10	4,5 (1,43-14,15)	0,008
CVC nos últimos 30 dias	9	11		0,175
Ventilação mecânica nos últimos 30 dias	10	5	7 (1,94-25,3)	0,002
Cirurgia nos últimos 30 dias	6	6		0,189

(Para a análise das variáveis quantitativas foi usado o teste *t*-Student e para as variáveis qualitativas o teste X^2 / Teste Exacto de Fisher)
OR = Odds ratio; CVC = cateter venoso central; DP = desvio padrão

de regressão logística condicional apenas as variáveis para as quais se obteve diferença estatisticamente significativa em análise univariada (antibioterapia, internamento e ventilação nos 30 dias precedentes e presença doença crónica), apenas a variável ventilação mecânica nos trinta dias precedentes mostrou ser um factor de risco independente para infecção por germens produtores de ESBL ($p = 0,002$; OR = 7).

Sete das crianças com infecção por germens produtores de ESBL receberam tratamento com antibiótico ao qual a bactéria era resistente *in vitro*. Destas, quatro eram situações de pielonefrite, uma colangite, uma infecção respiratória e uma infecção de ferida operatória. Nos restantes, a terapêutica antibiótica baseou-se nas susceptibilidades disponibilizadas pelo antibiograma: três receberam meropenem, quatro ciprofloxacina; cefoxitina, cotrimoxazol, amoxicilina/ácido clavulânico e piperacilina/tazobactam constituíram cada um a opção para uma criança.

Apenas uma das estirpes produtoras de ESBL era resistente ao imipenem, sendo as restantes susceptíveis de forma generalizada aos carbapenemos testados – Figura 1.

Faleceram duas crianças com infecção por germen produtor de ESBL durante o internamento: uma criança do sexo masculino, de 6 meses, ex-prematura de 26 semanas, com síndrome de intestino curto secundário a enterocolite necrozante e um adolescente de 12 anos do sexo masculino, com mucopolissacaridose. Os restantes tiveram uma evolução favorável.

Relativamente aos controlos, uma criança faleceu também no decurso da sua patologia de base (tetraparésia espástica após complicação de cirurgia de Fontan por cardiopatia complexa). Nos restantes a evolução foi favorável.

Tabela 5: Diagnóstico primário dos casos e dos controlos

Doença crónica / comorbilidade	Casos (n=20)	Controlos (n=40)
Malformações nefro-urológicas	7	3
Síndrome do intestino curto*	3	2
Atrésia das vias bilares	2	3
Doença metabólica (mucopolissacaridose, tirosinémia)	2	0
Síndrome de Ondine	1	0
Restrição do crescimento intra-uterino	1	0
Atrésia esofágica	1	2
Doença oncológica	0	4
Paralisia cerebral	0	2
Síndrome polimalformativo	0	2
Esfereocitose	0	1
Cardiopatia	0	1
Imunodeficiência primária	0	1
Infecção VIH*	0	1
Fibrose quística	0	1
Sem doença de base	3	18

*um caso apresentava 2 doenças de base: Síndrome do intestino curto e infecção VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana)

DISCUSSÃO

Tal como noutros estudos, o fenótipo de produção de ESBL foi mais vezes registado entre as estirpes de *Klebsiella* spp. Num trabalho efectuado entre 1999 e 2003 num hospital pediátrico em Filadélfia, a prevalência de germens produtores de ESBL no total de *Escherichia coli* isoladas foi de 7% e de 18% entre as estirpes de *Klebsiella* spp¹⁴. A razão da maior predisposição da *Klebsiella* spp para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos por produção de ESBL é desconhecida tendo, provavelmente, o seu fundamento a nível molecular¹⁴.

Entre nós, as infecções por bacilos produtores de ESBL ocorreram mais frequentemente em crianças do sexo masculino, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Noutro estudo realizado em população pediátrica, o sexo feminino foi considerado factor de risco para desenvolvimento de bacteriémia por germens produtores de ESBL¹⁴. Alguns autores mostraram

que a idade média das crianças infectadas com germens produtores de ESBL era significativamente menor do que aquelas com infecção causada por bacilos não produtores de ESBL¹⁵. Entre nós, embora a média da idade das crianças dos casos tenha sido inferior à dos controlos, essa diferença não mostrou ter significado estatístico, o que poderá apenas resultar da pequena dimensão da amostra.

Não verificámos diferença significativa, em termos estatísticos, no que se refere à necessidade ou duração de internamento para os dois grupos. A literatura não é consensual relativamente a este ponto. No entanto, num estudo caso-controlo semelhante, levado a cabo por Lautenbach em população adulta entre 1997 e 1998, verificou-se uma duração mais prolongada do internamento no grupo com infecção devida a germens produtores de ESBL⁹. Zaoutis evidenciou também, em idade pediátrica, uma maior duração de internamento após isolamento de germens produtores de ESBL¹⁴. No entanto a duração média de internamento não diferiu entre os grupos num estudo em crianças com bacteriémia¹⁵.

Alguns factores de risco para infecção por germens produtores de ESBL, presentes nas crianças da nossa amostra, como antibioterapia e ventilação mecânica invasiva prévias, haviam já sido evidenciados noutros trabalhos semelhantes^{15,16}. Tanto na população adulta como em idade pediátrica, o uso de antibióticos nos 30 dias prévios, nomeadamente cefalosporinas, foi considerado um factor de risco independente para infecção subsequente por germens produtores de ESBL^{9,14,15,17}. A pressão selectiva exercida pelo uso de antibióticos parece ser o factor mais importante na emergência de resistência por parte destes germens.

A presença de cateter venoso central nos 30 dias precedentes não foi mais frequente no grupo de crianças com infecção por germens produtores de ESBL. No entanto, este factor mostrou constituir factor de risco para bacteriémia por estes germens numa população pediátrica, embora apenas em análise univariada¹⁵.

A presença de patologia crónica obrigando a múltiplas admissões hospitalares foi mais frequente entre as crianças com infecção por germens produtores de ESBL, parecendo também constituir um factor de risco para infecção por estes microrganismos multirresistentes. Lautenbach tinha já demonstrado esta associação no seu estudo, carecendo no entanto de significado estatístico⁹. Contudo, no presente trabalho, o único factor de risco independente para infecção por germens produtores de ESBL foi a presença de ventilação mecânica nos 30 prévios. As crianças submetidas a ventilação mecânica apresentaram um risco sete vezes superior de desenvolver posteriormente infecção por germens produtores de ESBL. Podemos especular que este factor de risco poderá favorecer a colonização, predispondo posteriormente a infecção por germens resistentes. Estudos com amostras de maiores dimensões

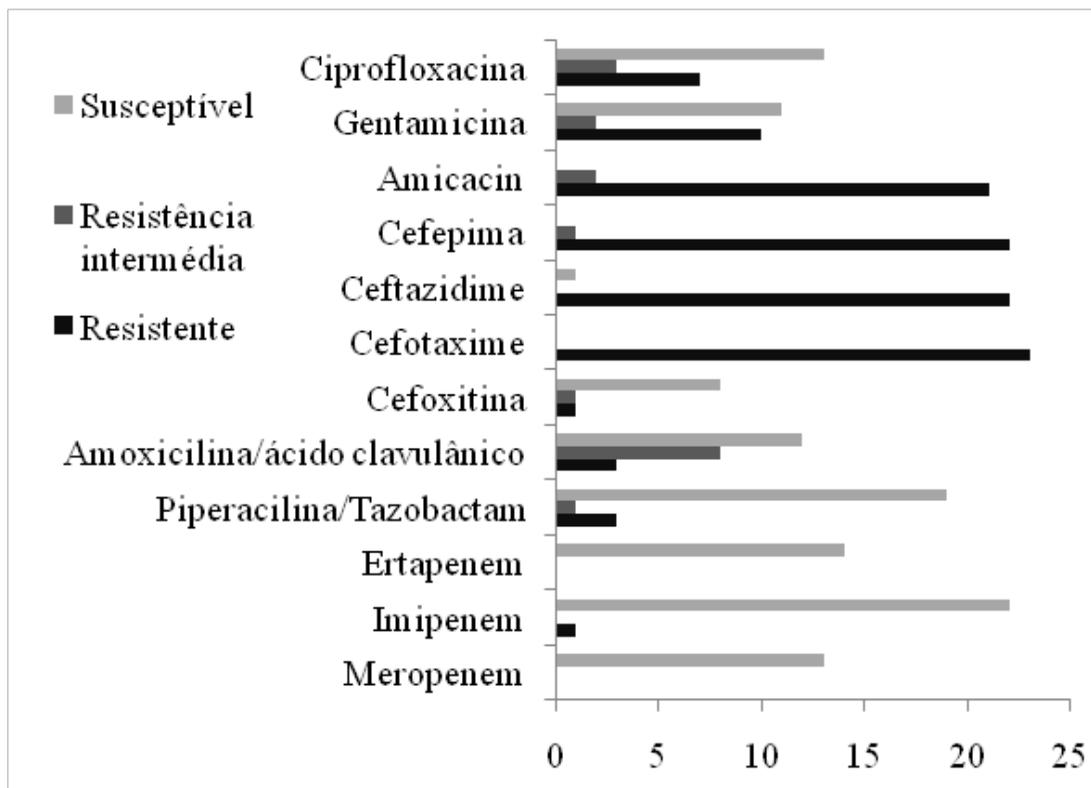


Fig. 1: Antibiograma dos bacilos gram negativos produtores de ESBL isolados (n=23).

terão que ser efectuados para confirmar estes resultados.

Embora anteriormente, em adultos e crianças, tenha sido demonstrada uma associação entre infecção por germens produtores de ESBL e mortalidade¹⁵, na nossa população não foi possível estabelecer essa relação. As duas crianças falecidas apresentavam patologia de base de mau prognóstico, que poderá ter condicionado a evolução clínica desfavorável, não sendo possível atribuir a causa da morte directamente à infecção.

O resultado do antibiograma dos bacilos isolados encontra-se em consonância com os dados da literatura, relativamente ao leque restrito de opções terapêuticas. Os carbapenemos têm demonstrado uma elevada taxa de sucesso clínico nestas infecções^{4,18,19}. Numa das crianças deste estudo foi isolado uma *Klebsiella pneumoniae* resistente ao imipenem, tornando limitadas as opções terapêuticas. A resistência aos carbapenemos constitui uma ameaça no combate a estes germens. Resulta da produção de carbapenemases e da expressão de enzimas tipo AmpC em combinação com a perda de porinas e dificuldade de penetração do antibiótico. Torna-se fundamental a identificação destas enzimas de forma a implementar medidas para impedir a sua disseminação a nível hospitalar²⁰.

Nalguns casos, a antibioterapia empírica não foi alterada após conhecimento de ausência de susceptibilidade *in vitro* disponibilizada pelo antibiograma, dado o curso clínico favorável, sendo a maioria dos casos infecções urinárias. Outros autores referem-se a esse facto, apontando defesas locais e a elevada concentração do fármaco atingida no sistema urinário como os principais facilitadores de uma evolução favorável nessas situações^{21,22}. É referido contudo que o mesmo já não parece verificar-se em relação a outro tipo de infecções, nomeadamente bacteriémia^{9,15}. Apesar dos inibidores das β -lactamases, como o tazobactam e o ácido clavulânico terem demonstrado inibir as ESBL *in vitro*, a associação β -lactâmico/inibidor das β -lactamases deverá ser usada com precaução no tratamento de infecções graves causadas por germens produtores de ESBL, uma vez que a susceptibilidade *in vitro* pode não prever a eficácia *in vivo*^{4,19}. Para explicar este facto tem sido proposto o efeito da quantidade de inoculo e da concentração inibitória mínima necessária¹⁷. O uso precoce de um antibiótico adequado, nomeadamente carbapenemo, parece reduzir a taxa de mortalidade nestas situações^{4,15,17}. Contudo, a combinação de piperacilina com inibidor das β -lactamases tazobactam, parece ser útil no tratamento de algumas infecções por germens produtores de ESBL²³.

Os aminoglicosídeos têm demonstrado eficácia variável, sendo o mais promissor a amicacina¹⁷. Apesar das quinolonas parecerem ser úteis no tratamento de infecções por germens produtores de ESBL, sobretudo na infecção urinária, as resistências parecem estar a aumentar¹⁷. O cefepime, uma cefalosporina de 4ª geração tem demonstrado ser uma boa alternativa, nomeadamente como terapêutica empírica²⁴.

Não foi possível estabelecer uma relação causal temporal entre os isolamentos de bacilos produtores de ESBL no nosso hospital. Ocorreram em enfermarias diferentes e ao longo de todo o período de estudo. No entanto, não foi efectuado o estudo molecular dos germens isolados que nos permita garantir a ausência de relação, sendo essa uma das limitações deste estudo. Contudo, noutros trabalhos, a análise epidemiológica molecular demonstrou a ausência de relação entre as estirpes isoladas, considerando como principal factor de risco a pressão positiva exercida pelo uso indiscriminado de antibióticos¹⁴. Uma das principais medidas para travar a disseminação destes germens em idade pediátrica passará pelo uso racional de antibióticos, nomeadamente as cefalosporinas.

Os factores de risco para colonização por germens produtores de ESBL parecem diferir dos da infecção. A duração do internamento parece ser o principal factor de risco para colonização²⁵. Os estudos de colonização fecal por estes germens têm sido efectuados a nível institucional, não existindo estudos multicêntricos na Europa. Num estudo espanhol verificou-se um aumento da frequência de portadores de 1% para 5% dos doentes em ambulatório e de 1% para 12% dos doentes internados, entre 1991 e 2003²⁶. Estudos de prevalência de colonização são de extrema importância para o controlo da disseminação a nível intra-hospitalar e para a implementação de medidas de controlo de infecção^{4,5,27}. Esta avaliação não foi incluída no nosso estudo.

O facto deste trabalho se basear numa análise retrospectiva coloca limitações, nomeadamente na qualidade da colheita de dados; e ainda, tratando-se de um estudo caso-controlo, é sempre possível cometer viés de selecção, que se tentou reduzir procedendo à selecção dos controlos por amostragem sistemática utilizando critérios bem definidos.

A prevalência de *Enterobacteriaceae* multirresistentes parece estar a aumentar quer a nível hospitalar quer a nível da comunidade, sendo também evidente este aumento em idade pediátrica²⁸. Apesar da pequena dimensão da nossa amostra, verificou-se um aumento do número de infecções por germens produtores de ESBL adquiridas na comunidade, no último ano de estudo, o que nos poderá alertar para este problema crescente na área de influência do hospital.

O presente estudo baseia-se num período limitado de tempo, numa amostra reduzida e foi realizado num hospital

pediátrico central, onde são prestados cuidados terciários a grande proporção de crianças com patologia crónica grave, podendo deste modo não reflectir a realidade pediátrica a nível nacional.

Em conclusão, o fenótipo produtor de ESBL foi detectado em 0.5% das *Escherichia coli* e 16.4% das *Klebsiella* spp identificadas no período de estudo num hospital pediátrico central, maioritariamente em infecções associadas aos cuidados de saúde. Presença de doença crónica, internamento, uso prévio de antibióticos e ventilação invasiva foram mais frequentes nas infecções por estes germens, no entanto apenas a última se revelou um factor de risco independente. A vigilância epidemiológica é necessária e fundamental bem como uma utilização racional de antibióticos.

AGRADECIMENTOS

A toda a equipa do Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Coimbra, nomeadamente a Henrique Oliveira pela interpretação dos dados microbiológicos e aos Técnicos Trindade Marques e Jorge Marques, pelos dados microbiológicos disponibilizados.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

REFERÊNCIAS

- HERZAM, GREENHOW TL, ALCANTARA J, HANSEN J, BAXTER RP, BLACK SB, ET AL. Changing epidemiology of outpatient bacteremia in 3- to 36-month-old children after the introduction of the heptavalent-conjugated pneumococcal vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 293-300
- PÉREZ-LLARENA FJ, BOU G. Beta-Lactamase Inhibitors: The Story so Far. *Curr Med Chem* 2009; 16: 3740-3765
- JACOBY GA. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Inft Dis Clin North Am* 1997; 11: 875-887
- PATERSON DL, BONOMO RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-686
- COQUE TM, BAQUERO F, CANTON R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13: 1-11
- DIEKEMA DJ, PFALLER MA, JONES RN, ET AL. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 595-607
- QUALE JM, LANDMAN D, BRADFORD PA, VISALLI M, RAVISHANKAR J, FLORES C, ET AL. Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella*

- pneumoniae* infection. Clin Infect Dis 2002; 35: 834-841
8. QIN X, ZERR DM, WEISSMAN SJ, ENGLUND JA, DENNO DM, KLEIN EJ, ET AL. Prevalence and Mechanisms of Broad-Spectrum β -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae*: a Children's Hospital Experience. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2008; 52: 3909-3914
 9. LAUTENBACH E, PATEL JB, BILKER WB, EDELSTEIN PH, FISHMAN NO. Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. CID 2001; 32: 1162-1171
 10. FERRECH M, COENEN S, MALHOTRA-KUMARS, DVORAKOVA K, HENDRICKX E, SUETENS C, ET AL, ON BEHALF OF THE ESAC PROJECT GROUP. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2006; 58: 401-407
 11. GARNER JS, JARVIS WR, EMORI TG, HORAU TC, HUGHES JM. CDC definitions for nosocomial infections. Am J Infect Control 1998; 16: 128-140
 12. EMORIA TG, GAYNES RP. An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 428-442
 13. WIEGAND I, GEISS HK, MACK D, STURENBURG E, SEIFERT H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. J Clin Microbiol 2007; 45: 1167-1174
 14. ZAOUTIS TE, GOYAL M, CHU JH, COFFIN SE, BELL LM, NACHAMKIN I, ET AL. Risk factors for and outcomes of bloodstream infection caused by Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in children. Pediatrics 2005; 115: 942-949
 15. KIM YK, PAI H, LEE HJ, PARK SE, CHOI EH, KIM J, ET AL. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1481-1491
 16. KUSTER SP, HASSE B, HUEBNER V, BANSAL V, ZBINDEN R, RUEF C, ET AL. Risk factors for infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary care university hospital in Switzerland. Infection 2010; 38: 33-40
 17. RAMPHAL R, AMBROSE PG. Extended-spectrum lactamases and clinical outcomes: current data. CID 2006; 42: 164-172
 18. KASSAA, SUMATI N, YULIYA Y, BARBARAAJ. Carbapenems in pediatrics. Therapeutic Drug Monitoring 2003; 25: 593-599
 19. FALAGAS ME, KARAGEORGOPOULOS DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. J Hosp Infect 2009; 73: 345-354
 20. OVERTURF GD. Carbapenemases. A brief review for pediatric infectious disease specialists. Pediatr Infect Dis J 2010; 29: 68-70
 21. NAUMOVSKI L, QUINN JP, MIYASHIRO D, PATEL M, BUSH K, SINGER SB, ET AL. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended Spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1991-1996
 22. MEYER KS, URBAN C, EAGEN JA, BERGER BJ, RAHAL JJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. Ann Intern Med 1993; 119: 353-358
 23. PILLAY T, PILLAY DG, ADHIKARI M, STURM AW. Piperacillin/Tazobactam in the Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Infections in Neonates. Am J Perinatol 1998; 15: 47-51
 24. ZANETTI G, BALLY F, GREUB G, GARBINO J, KINGE T, LEW D, ET AL, Cefepime Study Group. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3442-3447
 25. BISSON G, FISHMAN NO, PATEL JB, EDELSTEIN PH, LAUTENBACH E. Extended-spectrum β -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
 26. VALVERDE A, COQUE TM, SÁNCHEZ-MORENO MP, ROLLÁN A, BAQUERO F, CANTÓN R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004; 42: 4769-4775
 27. HARRIS AD, MCGREGOR JC, JOHNSON JA, STRAUSS SM, MOORE AC, STANDIFORD HC, ET AL. Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Bacteria and Intensive Care Unit Admission. Emerg Infect Dis 2007; 13: 1144-1149
 28. QUINN JP, MIYASHIRO D, SAHM D, FLAMM R, BUSH K. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1451-1456