

ACERVO: 65048

13839500/06

26940

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM PATOLOGIA

**Pé diabético: etiologia e resistência a antimicrobianos de cepas  
isoladas de 141 pacientes atendidos no Centro Integrado de Diabetes e  
Hipertensão do Estado do Ceará**

**RENATO MOTTA NETO**

10/06  
618-2116  
MST

Fortaleza - Ceará

2003

RENATO MOTTA NETO

**PÉ DIABÉTICO: Etiologia e Resistência a antimicrobianos de cepas isoladas de 141 pacientes atendidos no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão do Estado do Ceará**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre.

**Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho**  
**Orientadora**

**Fortaleza - Ceará**  
**2003**

M875p Motta Neto, Renato

Pé diabético: etiologia e resistência a antimicrobianos de cepas isoladas de 141 pacientes atendidos no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão do Estado do Ceará / Renato Motta Neto. Fortaleza, 2003.

84 fs.;il

Orientador: Profa. Dra Cibele Barreto Mano de Carvalho  
Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina

1. Pé diabético 2. Pé diabético-Microbiologia  
3. Pé diabético-patologia I. Título

CDD 616.462

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do Título de Mestre.

Aprovado em 21/02/ 2003

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho**  
**(Presidente)**

---

**Profa. Dra. Dulce Almeida**

---

**Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota**

---

**Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, por tudo que eles representam para mim e à Deus, por muitas graças derramadas em nossas vidas.

## AGRADECIMENTOS

- À todos os funcionários do ambulatório do pé diabético do Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão, pela ajuda e apoio.
- Aos bolsistas Paulo Sávio Magalhães, Luciana Passos Aragão e Alber Moraes Dias, pelo apoio técnico na elaboração deste estudo.
- À professora Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho, pela orientação, apoio e disponibilidade que muito contribuiu para o engrandecimento deste trabalho.
- À Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa, pelo apoio financeiro.
- Agradecimento especial a Dra. Margarida Mota de Oliveira e ao Prof. Marcelo Bezerra Nogueira, pelo apoio dado na elaboração deste trabalho.
- Aos funcionários Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues, Graziela Nogueira da Silva e José Olavo Moraes pela ajuda prestada na realização da coleta e análise dos espécimes.

*NOTA: Este trabalho foi submetido a análise com posterior aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da UFC (COMPEPE), protocolado sob o número:05/00 e Ofício: 10/00*

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Distribuição dos pacientes quanto ao sexo	22
Tabela 2:	Distribuição dos pacientes quanto à faixa etária	23
Tabela 4:	Distribuição dos pacientes quanto à ocupação	23
Tabela 3:	Distribuição dos pacientes quanto à procedência	24
Tabela 5:	Distribuição dos pacientes quanto à duração do diabetes	24
Tabela 6:	Distribuição da taxa glicêmica dos pacientes estudados	25
Tabela 7:	Distribuição dos pacientes quanto à origem da lesão	25
Tabela 8:	Distribuição dos pacientes quanto ao tipo de infecção	26
Tabela 9:	Distribuição dos pacientes quanto à classificação de Wagner	27
Tabela 10:	Distribuição dos pacientes que faziam uso de antimicrobianos	27
Tabela 11:	Espécies bacterianas isoladas de úlceras infectadas em 141 pacientes diabéticos	28

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Quadro I: Classificação de Wagner	5
Quadro 2:	Espécies e/ou grupos bacterianos isolados de 141 pacientes	30
Quadro 3:	Espécies e/ou grupos bacterianos isolados de 141 diferentes úlceras segundo a classificação de Wagner	31



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Percentual de bactérias isoladas quanto ao grupo	32
Figura 2:	Perfil de resistência aos beta-lactâmicos de 156 cepas de enterobactérias	33
Figura 3:	Percentual de resistência a antimicrobiano de 156 cepas de enterobactérias	34
Figura 4:	Percentual de enterobactérias que apresentam beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)	35
Figura 5:	Percentual de resistência a antimicrobianos de 61 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Figura 6:	Percentual de resistência de resistência a antimicrobianos de 61 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	37

## RESUMO

Cento e quarenta e um pacientes diabéticos apresentando úlceras infectadas foram atendidos no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão do estado do Ceará no período de 01/03/2000 a 30/11/2001 e submetidos a um estudo microbiológico no laboratório de microbiologia do departamento de medicina legal / Universidade Federal do Ceará. Destes, 98 (69,5%) apresentaram infecções do tipo polimicrobiana onde a classificação de Wagner mais prevalente no estudo foi a de Grau II, presente em 44,0% dos pacientes. Foram isoladas 298 bactérias, apresentando a seguinte distribuição: 177 (59,4%) bacilos Gram negativos, 85 (28,5%) cocos Gram positivos, e 36 (12,1%) anaeróbios estritos; dos quais 10 (3,4%) pertenciam ao grupo *Bacteroides fragilis* e 09 (3,0%) cepas de *Peptostreptococcus* sp. Do grupo dos bacilos Gram negativos, 156 (52,4%) pertenciam a família das *Enterobacteriaceae* e apenas 21 (7,0%) pertenciam a espécie de *Pseudomonas aeruginosa*. Da família *Enterobacteriaceae* as espécies mais frequentes foram: *Klebsiella pneumoniae* (11,1%), *Morganella morganii* (10,4%) e *Escherichia coli* (8,1%). Desta família foram identificadas 10 cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) (6,0%), pertencentes as espécies *K. pneumoniae* (7 cepas), *E.coli* (3 cepas). As enterobactérias foram isoladas de 83,7% dos pacientes e o *Staphylococcus aureus* de 43,2%. Vale ressaltar o isolamento de *Streptococcus pyogenes* em 7,8% dos pacientes. Das cepas de *Staphylococcus aureus* 07 (11,5%) apresentaram resistência à oxacilina (cepas ORSA). Todos os pacientes infectados por cepas ORSA relataram internações e/ou uso de antimicrobianos nos meses anteriores à coleta. Por ser o Diabetes Mellitus tipo 2 uma doença endêmica e o pé diabético sua complicação mais frequente; faz-se necessário que se crie nos centros de diabetes uma rotina para identificação dos agentes etiológicos causadores destas infecções.

## ABSTRACT

One-hundred-forty-one diabetic patients exhibiting infected ulcers were treated at the Diabetic Center of Ceará from 01/03/2001 to 30/11/2001 and were submitted to a microbiology study at the microbiology laboratory of the legal medicine department/Federal University of Ceará, Brazil. Of these, 98 (69.5%) patients showed infections of the type polymicrobial where the classification of wagner prevalent in the studies was the degree II, found in 44% of the patients. 298 bacteria were isolated showing the following distribution: 177 (59.4%) Gram-negative bacilli; 85 (28.5%) Gram-positive cocci; and 36 (12.1%) stricts anaerobes of, which 10 (3.4%) belong to the group of *Bacteroides fragilis* and 9 (3%) to the species *Peptostreptococcus*. The group of Gram-negative bacilli, 156 (52.4%) belongs to the *Enterobacteriaceae* family and only 21 (7%) belongs to the species *Pseudomonas aeruginosa*. The most frequent of the *Enterobacteriaceae* family were: *Klebsiella pneumoniae* (11.1%), *Morganella morganii* (10.4%) and *Escherichia coli* (8.1%). From this family, the following *K. pneumoniae* species (07 strains), *E. coli* (03 strains). *Enterobacteriaceae* were isolated from 83.7% of the patients and *Staphylococcus aureus* from 43.3%. It is worth noting that the isolation of *Streptococcus pyogenes* was seen in 7.8% of the patients. The strains of *S. aureus* 07 (11.5%) introduced resistance to Oxacillin (strains ORSA). All the patients infected by strains ORSA were interned and/or treated with antimicrobial during the few months prior to the study. As diabetes mellitus type 2 is an endemic disease giving rise to diabetic foot, complications are more frequent. Therefore, a routine needs to be created in the diabetes centres to identify etiological agents, the causes of these infections.

## SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Tabelas	vi
Lista de Quadros	vii
Lista de Figuras	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes Mellitus e Aspectos Epidemiológicos	1
1.2 Complicações Crônicas do Diabetes Mellitus	2
1.3 Pé Diabético	3
1.4 Bacteriologia do Pé Diabético	5
1.5 Resistência Bacteriana a Antimicrobianos	7
1.5.1 Resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterobacteriaceae</i>	9
1.5.2 Importância da Resistência	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Geral	12
2.2 Específicos	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Tipo de Estudo	13
3.2 Período e Local do Estudo	13
3.3 População do Estudo	14
3.4 Coleta e Transporte	14
3.5 Isolamento e Identificação de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Facultativas	15
3.5.1 Identificação de Cocos Gram Positivos	15
3.5.2 Identificação de Bacilos Gram Negativos	16
3.6 Isolamento e Identificação de Bactérias Anaeróbias Estritas	16
3.7 Estudo do Perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos	17
3.7.1 Antibiograma de Bactérias Anaeróbias Facultativas e Aeróbias Estritas	17
3.8 Controle de Qualidade dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos	21

4 RESULTADOS	22
4.1 Estudo microbiológico	29
4.2 Estudo do perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos	32
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
Anexos	

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Diabetes Mellitus e Aspectos Epidemiológicos

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla; é um dos mais importantes problemas de saúde na atualidade, tanto em termos do número de pessoas afetadas, incapacitações, mortalidade prematura, como dos custos envolvidos no controle e tratamento de suas complicações (DINIZ, 2000). A classificação atual do Diabetes Mellitus inclui estágios clínicos do diabetes e está dividida em diferentes categorias:

- Diabetes Mellitus tipo 1: resulta da destruição das células beta do pâncreas, levando a deficiência absoluta de insulina, de natureza auto-imune ou idiopática, com tendência a cetoacidose.
- Diabetes Mellitus tipo 2: forma mais prevalente de Diabetes Mellitus, resulta de resistência à insulina e deficiência na sua secreção. A maioria destes pacientes são obesos e a cetoacidose só ocorre em situações especiais como infecção.
- Diabetes Gestacional: é a diminuição da tolerância à glicose, em qualquer grau, diagnosticada pela primeira vez durante a gestação.
- Outros tipos específicos: defeitos genéticos funcionais da célula beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidos por fármacos e agentes químicos, infecções, formas incomuns de diabetes imuno-mediado e outras síndromes genéticas geralmente associadas ao diabetes.

Do total de casos de diabetes, 90% são do tipo não-insulino-dependente (tipo 2), 5 a 10% do tipo insulino-dependente (tipo 1) e 2% do tipo secundário ou associado a outras síndromes (DINIZ, 2000). Atualmente, nos Estados Unidos são de 14 milhões o número de pacientes com esta patologia e no Brasil estima-se que o número chegue a cinco milhões de

diabéticos, dos quais metade desconhece o diagnóstico. A prevalência de diabetes no Brasil, na população urbana de 30 a 69 anos é de 7,6%. Pacientes diabéticos com úlceras infectadas representam a maioria dos pacientes diabéticos nos hospitais brasileiros. A prevalência é de 6,4% no Estado do Ceará, com taxa de desconhecimento da doença de 64% (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002).

A situação epidemiológica do Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM-2) o torna problema de saúde pública da maior importância. Consta-se no DM-2 uma situação peculiar, embora não exclusiva: a doença evolui habitualmente durante anos com sintomatologia pouco expressiva, pouco valorizada pelos pacientes ou avaliada como inespecífica pelos médicos. O fato importante: quando confirmado o diagnóstico, já transcorreu um intervalo de tempo de duração variável durante o qual os distúrbios metabólicos já causaram danos. Os alvos mais atingidos são os vasos e nervos que resultam nas frequentes e inevitáveis complicações crônicas do paciente diabético (DINIZ, 2000).

## **1.2 Complicações Crônicas do Diabetes Mellitus**

Os pacientes com diabetes são susceptíveis a uma ampla gama de complicações clínicas. Estas complicações crônicas são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos portadores de diabetes (NATHAN et al, 1997). Dentre estas complicações, destacam-se a retinopatia com perda de visão, nefropatia, evoluindo para insuficiência renal crônica, neuropatia autonômica, neuropatia periférica com risco para ulceração, amputação e doença vascular periférica. As três primeiras categorias de complicações são relativamente específicas do diabetes e caracterizam-se por alterações endoteliais patológicas, como o espessamento da membrana basal e a permeabilidade vascular aumentada. Por esta razão, a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia são categorizadas como complicações microvasculares do diabetes. A susceptibilidade aumentada à aterosclerose e as complicações que dela decorrem são categorizadas como complicações macrovasculares (CLEMENTS, 1997).

A neuropatia diabética periférica e a doença vascular periférica são as mais importantes dentre essas complicações. A neuropatia diabética periférica parece ser a forma mais comum de complicação crônica do Diabetes Mellitus. É definida como qualquer desordem sintomática clinicamente evidente ou subclínica, que acontece na vigência do diabetes, incluindo manifestações somáticas e/ou autonômicas no sistema nervoso periférico e autonômico (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997).

A doença vascular periférica acomete principalmente as artérias tibial e peritibial entre joelho e pé. Leva a uma diminuição da perfusão arterial para os membros inferiores, contribuindo para a ulceração, dificultando a cicatrização das feridas, diminuindo a nutrição tissular e a capacidade de combater infecções (LEVIN, 1995).

### 1.3 Pé Diabético

Dentre as complicações crônicas do diabetes, a neuropatia periférica que pode levar a ulcerações nos pés com potencial evolução com infecção e amputação representa uma das mais importantes. Segundo o consenso internacional sobre o pé diabético de 2001, o pé diabético é definido como qualquer infecção, ulceração e/ou destruição dos tecidos profundos associados à anormalidades neurológicas e a vários graus de doença vascular periférica dos membros inferiores (CONSENSO INTERNACIONAL SOBRE PÉ DIABÉTICO, 2001).

Os diabéticos apresentam maior propensão às ulcerações nos membros inferiores e infecções. Dentre todas as infecções que o paciente diabético possa apresentar, a que causa maior morbidade é a infecção do pé. Estima-se que cerca de 25% dos pacientes diabéticos sofrem deste mal durante a vida (SAPICO et al, 1984). O Diabetes Mellitus pode dar origem aos problemas do pé, já que pode predispor o paciente à aterosclerose periférica com isquemia associada, ou pode causar uma neuropatia periférica com alterações proprioceptivas, assim como, na sensibilidade ao choque ou à dor e atrofia secundária dos músculos esqueléticos nas pernas e nos pés. Os problemas comuns dos pés que podem evoluir para infecção, atuando como porta de entrada são: vesículas (bolhas), calosidades, verrugas, fissuras, infecção



fúngica interdigital, paroníquia, unhas encravadas, acidentes associados ao corte das unhas e queimaduras. As úlceras resultam de múltiplos mecanismos fisiopatológicos sendo a neuropatia sensório-motora e autonômica, e a doença vascular periférica os principais fatores predisponentes. A neuropatia é de longe o motivo mais comum da formação de ulcerações no pé, levando à infecção (SPICHLER et al, 1998). A patogênese proposta é a seguinte: a distribuição desigual da pressão na superfície plantar do pé, possivelmente agravada, até certo ponto pela redução da gordura do pé, leva ao microtrauma tecidual, que serve como porta de entrada para as bactérias que inicialmente colonizam as fissuras. As infecções fúngicas superficiais podem, da mesma forma, servir como porta de entrada. O paciente não apresenta resposta dolorosa ao trauma inicial, devido à neuropatia subjacente. Deste modo, o trauma continua e associa-se à necrose tecidual. Por fim, o movimento das estruturas dentro do pé promove a colonização bacteriana mais profunda e a disseminação com infecção secundária, levando ao aumento da inflamação local, à liberação de mediadores inflamatórios e ao maior comprometimento da capacidade de limitar a infecção inicial. Estes eventos resultam em infecção dos tecidos moles, ou óssea, associada à necrose, que, finalmente, pode levar à perda da extremidade inferior, associada ou não à bacteremia e sepse (GATES, 1997).

A ulceração e infecção associada pode ser superficial ou profunda e/ou com comprometimento de estruturas subjacentes à lesão e necrose culminando com a amputação do membro. Com o objetivo de classificar estas lesões, Wagner propôs um estadiamento das mesmas, variando do Grau 0 à Grau V, como mostra o quadro abaixo:

### Quadro I: Classificação de Wagner

Grau 0	Ausência de lesão aberta, presença de calosidades e deformidades (dedos em garra, proeminência de cabeças de metatarsos).
Grau I	Úlcera superficial, bolhas, escoriação, infecção fúngica
Grau II	Profunda, penetrando tecido adiposo subcutâneo até os tendões ou ligamentos, clinicamente infectada
Grau III	Infecção profunda, abscessos, osteomielite
Grau IV	Gangrena localizada em dedos, ante pé ou calcânhar
Grau V	Gangrena de todo o pé

Fonte: Wagner, F.W. Tratamento do pé diabético. *Endocrinology*, v.10, n° 4, p.29-38, 1984.

Outros fatores como; sexo, tabagismo, peso, altura, diabetes de longa duração (acima de 10 anos), idade avançada (acima de 40 anos), hipertensão arterial, alterações biomecânicas, apresentam um sinergismo na presença de um quadro de neuropatia, favorecendo assim o surgimento de ulcerações (BOULTON et al, 1986; FOSTER et al, 1987; CRAUSAZ et al, 1988).

#### 1.4 Bacteriologia do Pé Diabético

A infecção do pé diabético pode ser monomicrobiana ou polimicrobiana, o que ocorre em 60 a 80% dos pacientes. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são isoladas de cerca de 60% de todas as úlceras infectadas. Enterococos, estreptococos e enterobactérias são encontrados menos freqüentemente, e 15% das úlceras infectadas têm a participação de

bactérias anaeróbias estritas (ROUTH et al, 1996). Estudo realizado por Lipsky *et al*, publicado em 1990, mostraram que o perfil bacteriológico de uma infecção de úlcera de pé diabético está diretamente ligado ao nível de comprometimento da infecção. Infecções com leve comprometimento tecidual predominam organismos do tipo aeróbios. O perfil bacteriológico dos espécimes clínicos provenientes de infecções leves estudado por Lipsky *et al*, apresentavam um predomínio de cocos Gram positivos em especial o *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram negativos, destacando as espécies pertencentes a família das *Enterobacteriaceae*. Apenas um pequeno percentual destes espécimes apresentavam bactérias anaeróbias. Lipsky *et al* também destacaram a presença de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de uma forma ocasional em seu estudo.

As infecções de úlceras de pé diabético que apresentam um severo comprometimento tecidual isto é; presença de necrose, gangrena, intenso quadro de celulite, abscessos com ou sem osteomielite são tipicamente polimicrobianas com participação de bactérias anaeróbias estritas (LOUIE et al, 1976; SAPICO et al, 1984.; WHEAT et al, 1986).

A participação de bactérias anaeróbias estritas em úlceras infectadas de pacientes diabéticos foi pela primeira vez documentada, em 1976, por Louie *et al* 1976. Estes autores examinaram pacientes ambulatoriais e isolaram anaeróbios de 18 dos 20 pacientes acompanhados.

Sapico *et al* em pesquisa publicada em 1984, com 32 pacientes submetidos posteriormente a amputações constataram que 25 (78%) destes apresentavam infecções do tipo polimicrobiana, e que as bactérias anaeróbias isoladas dos espécimes estavam associadas as lesões que apresentavam odor pútrido. Dos 154 isolados bacterianos deste estudo, 91 (59%) eram bactérias aeróbias e 63 (41%) eram anaeróbias. Dentre o grupo das bactérias aeróbias a família que obteve uma maior frequência de isolamento foi a das *Enterobacteriaceae*. Já no grupo dos anaeróbios o gênero com maior frequência de isolamento foi *Bacteroides* sp.

Lawrence *et al* (1994) descreveram o perfil de isolamento bacteriano de infecção de tecido mole e osteomielite em pacientes diabéticos com úlceras infectadas. Em estudo retrospectivo de 7 anos com pacientes hospitalizados, os autores avaliaram 22 casos de osteomielite e 44 casos de úlcera associada à infecção de tecidos moles. O *Staphylococcus*

*aureus* foi isolado de 68% dos pacientes seguido de *Streptococcus* sp (43%) e *Enterococcus* sp (27%). *Pseudomonas* sp foi a mais freqüentemente isolada de pacientes com osteomielite (38%), do que de pacientes com infecção de tecidos moles (18%). Bactérias anaeróbias estritas foram isoladas de 11% dos pacientes.

Goldstein *et al* (1996) em estudo prospectivo com pacientes diabéticos e não hospitalizados apresentando úlceras infectadas isolaram predominantemente *Staphylococcus aureus* em 76% dos pacientes incluindo cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) em 20% dos casos. Os autores chamam atenção para o percentual de 20% de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina e para o aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos na população americana, ocorrendo tanto nos hospitais quanto nas comunidades.

### 1.5 Resistência Bacteriana a Antimicrobianos

O conhecimento do fenômeno da resistência aos agentes físicos e químicos entre microorganismos, data do início da era microbiana. Com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidades quimioterápicas específicas, Ehrlich *et al* (1907), verificaram que a resistência podia ocorrer em elementos de uma mesma população microbiana, observando que em culturas de tripanossomas tratados com arsênico ou com determinados corantes havia a sobrevivência de alguns exemplares de uma mesma colônia. O advento do uso clínico das Sulfonamidas, em 1933 e, em seguida da Penicilina, em 1941, levou à constatação de que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos podia ser uma característica natural das espécies de bactérias a ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível (TAVARES, 1996).

Ao descobrir a Penicilina em 1929, Fleming foi o primeiro observador da resistência natural de microorganismos aos antibióticos, descrevendo que bactérias do grupo coli-tifóide não eram inibidas pelo antibiótico. A causa desta resistência natural foi, pouco depois, descoberta por Abraham e Chain, que, em 1940, um ano antes de sua primeira publicação

sobre o uso clínico da Penicilina, demonstraram em extratos de *Escherichia coli* uma enzima capaz de destruir a ação da Penicilina, a qual denominaram penicilinase. A difusão do uso clínico da Penicilina trouxe ao conhecimento o fato de que entre microorganismos sensíveis ao antibiótico havia o encontro de cepas resistentes, sendo verificado por Kirby *et al* (1944), em que alguns estafilococos isolados de material clínico mostravam-se resistentes à Penicilina devido à produção de penicilinase. Em 1946, cerca de 5% dos estafilococos isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à Penicilina. Em 1949 esta resistência podia ser notada em 29% dos germes isolados em hospitais; em 1950 atingia 50% e em 1959 era de cerca de 80% em hospitais americanos (BAUER *et al*, 1960).

Em 1959, multiresistência às drogas, transmissível, foi encontrada em cepas de *Shigella* sp isoladas de pacientes com disenteria no Japão e, no final dos anos 70 uma resistência multidroga surgiu novamente, primeiro em *Staphylococcus aureus* e depois em uma variedade de bacilos Gram negativos, particularmente aqueles responsáveis por surtos de infecções hospitalares. A descoberta de cepas de *Haemophilus influenzae* e de *Neisseria gonorrhoeae* que haviam adquirido plasmídios com codificação de beta-lactamase, demonstrou que a resistência não é apenas um fenômeno restrito aos patógenos das infecções hospitalares, mas um fenômeno que pode se desenvolver com qualquer patógeno (TENOVER, 2000).

Na atualidade, a resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias e já são conhecidos muitos dos mecanismos bioquímicos de resistência e os mecanismos moleculares de transferência de resistência entre as bactérias. Sabe-se também, que a capacidade das bactérias serem resistentes às drogas antimicrobianas não é uma propriedade nova ou dependente do emprego dos antibióticos, uma vez que estafilococos isolados em 1937 e preservados em culturas mostraram-se produtores de beta-lactamases e que exemplares de *Bacillus licheniformis* preservados na raiz de uma planta estocada no Museu Britânico desde 1689 também produziam uma beta-lactamase similar à produzida por amostras do mesmo bacilo dos tempos atuais. Estes exemplos são demonstrativos históricos de que características genéticas codificadoras de resistência aos antimicrobianos existiam nestas bactérias muito tempo antes do primeiro uso da Penicilina (MEDEIROS *et al*, 1984; KIEHL, 1973).

Nas últimas décadas o que se tem observado é que a disseminação de microrganismos com múltipla resistência às drogas estão ocorrendo tanto nos hospitais quanto nas comunidades. Isto representa o resultado da interação de vários fatores, o mais importante dos quais, seja talvez, a pressão seletiva que estes sofrem para sobreviver na presença de agentes antimicrobianos. Dois grupos importantes de bactérias que vem apresentando crescente resistência à antimicrobianos e estão freqüentemente envolvidos nas infecções das úlceras em pacientes diabéticos, são os estafilococos e as enterobactérias (TENOVER, 2000).

### 1.5.1 Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* e *Enterobacteriaceae*

*Staphylococcus aureus* é o mais importante patógeno relacionado com infecções hospitalares e continua, como o principal causador de infecções adquiridas na comunidade, na maioria dos países. Está presente na microbiota residente de 10 a 20% da população. Os sítios dominantes de colonização são as fossas nasais, axila e períneo. A faringe e outros sítios cutâneos são também freqüentemente colonizados. Dada a alta taxa de portador de *Staphylococcus aureus*, não é surpresa que a infecção comunitária por *S. aureus* seja comum. Grupos de risco aumentados para infecção comunitária por *S. aureus*, são pacientes com Diabetes Mellitus, doenças dermatológicas crônicas, pacientes que requerem diálises e usuários de droga intra-venosas (LOWI, 1998; KAUFFMAN, 1997).

A primeira cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina foi isolada em 1960, logo após a introdução da Meticilina na terapêutica. Naquela data o número de isolados de MRSA era em torno de 0,1%, mas desde então tem-se disseminado em todo o mundo. Estas cepas são freqüentemente isoladas em ambientes onde a pressão seletiva é alta, como nos hospitais. Desde a emergência de cepas MRSA, a Vancomicina tem sido o único antimicrobiano uniformemente efetivo para o tratamento de infecções por *S. aureus*. Em 1996 foi relatado o primeiro caso de reduzida susceptibilidade à Vancomicina (definida como uma concentração inibitória mínima entre 8 e 16µg/ml) em um paciente do Japão. O surgimento de

infecções virtualmente intratáveis é o espectro que ronda a comunidade médico-científica na atualidade (DYKEK & GREGORY, 1997; HIRAMATSU et al, 1997).

As enterobactérias são um dos importantes grupos de patógenos tanto em infecção comunitária, como hospitalar. Normalmente são saprófitas humanas, colonizam o trato gastrointestinal e a nasofaringe. Geralmente amostras clínicas de enterobactérias apresentam resistência intrínseca à ampicilina, carbenicilina e cefalosporinas de primeira geração devido a produção de beta-lactamases, como SHV-1 e TEM-1. No entanto, na década de 80, bactérias exibindo resistência às cefalosporinas de espectro ampliado, devido às mutações nos genes blaTEM e blaSHV foram descritas. Por conferirem resistências às cefalosporinas de espectro ampliado, tais como, Cefotaxima, Ceftriaxona e Ceftazidima essas beta-lactamases foram denominadas de espectro ampliado (extended spectrum  $\beta$ -lactamases-ESBL). O primeiro microorganismo resistente a cefalosporina de espectro estendido foi isolado na Alemanha em 1983, sendo ainda reportado pela primeira vez como surto na França em 1985. Inicialmente ESBLs foram limitadas a *Klebsiella* sp, especialmente *Klebsiella pneumoniae*, sendo que atualmente existem relatos de ESBLs detectadas de numerosas espécies de enterobactérias incluindo *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Proteus* sp (SANDERS et al, 1996).

Em 1997, o programa de vigilância de resistência à antimicrobianos (SENTRY) avaliou a ocorrência de ESBLs em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* em países da América Latina; e constatou que a ocorrência de ESBLs em cepas de *Klebsiella pneumoniae* (41,8%) é bem maior que em cepas de *Escherichia coli* (10,3%).

Estudo realizado em 1999 em 35 hospitais do Brasil, observou que 48% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e 10% das cepas de *Escherichia coli* isoladas eram produtoras de ESBL (GUZMÁN-BLANCO et al, 2000).

### 1.5.2 Importância da Resistência

O desenvolvimento das drogas antimicrobianas, produziram uma decisiva redução na mortalidade e na morbidade de inúmeras doenças infecciosas. Paralelamente, porém, a administração destas drogas à população humana e o seu uso na medicina humana, veterinária e na agricultura, favoreceram a seleção de microorganismos resistentes e levaram à presente condição, na qual os antimicrobianos estão perdendo sua eficácia. Tal fato, foi de início, observado, principalmente em hospitais. Mas, é agora também reconhecido no meio comunitário. Esta situação é atribuída principalmente ao uso inadequado dos antibióticos para o tratamento e profilaxia em infecções humanas e à administração das drogas em animais com finalidades terapêuticas, profiláticas e de promoções do crescimento, levando à seleção de microorganismos resistentes em sua microbiota (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1983).

O combate à resistência bacteriana pode ser realizado através de diversas medidas, tais como: reversão ao estado de sensibilidade primitiva por perda de fatores de resistência ou por mutação, uso de altas concentrações de antimicrobianos (para superar o mecanismo de inativação), rodízio de uso de antimicrobianos em hospitais, uso de associações, descoberta de novas drogas, inibição dos mecanismos bioquímicos da resistência, limitação do uso de antimicrobianos (promoção do crescimento de animais) e a restrição ao uso de antimicrobianos que é certamente a medida mais importante devido os antimicrobianos serem restringidos a indicações clínicas bem precisas, tanto em medicina humana como na veterinária (TAVARES, 1996).

A necessidade de se criar estratégias para o controle do uso racional de antimicrobianos deve ser vista de forma urgente e preocupante, pois se os centros de saúde, hospitais, ambulatórios e órgãos competentes não atuarem de forma mais enérgica, orientando os prescritores a respeito desta problemática, em pouco tempo perderemos todo o nosso arsenal terapêutico.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

- Traçar o perfil de isolamento de cepas bacterianas isoladas de úlceras infectadas em pacientes ambulatoriais e atendidos no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão do Ceará (CIDH).

### 2.2 Específicos

- Determinar a sensibilidade a antimicrobianos das cepas prevalentes isoladas destes pacientes.
- Analisar os resultados obtidos e correlaciona-los com os dados dos pacientes.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Tipo de Estudo**

Trata-se de um estudo transversal descritivo em que participaram 141 pacientes (77 homens e 64 mulheres), onde estes, foram submetidos antes da coleta do espécime clínico a uma triagem (Anexo II) feita no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão do Ceará (CIDH) em Fortaleza, local da realização da pesquisa.

#### **3.2 Período e Local do Estudo**

O Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão é um centro de referência secundária estadual que atua na área de diabetes, composta por uma equipe interdisciplinar e ambulatório especializado em pé diabético. A triagem do paciente é feita como rotina no centro, com o intuito de estabelecer o diagnóstico de diabetes, bem como, avaliar as condições do paciente no que se refere a: controle de pressão, taxa glicêmica, alimentação e estado geral.

Os espécimes clínicos foram coletados no período compreendido entre 01/03/2000 a 30/11/2001, no Ambulatório do Pé Diabético (CIDH). Após coleta, foram processados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

### 3.3 População do Estudo

Os pacientes atendidos procuraram voluntariamente o serviço do ambulatório do pé diabético com queixas de lesões em membros inferiores. Informações sobre idade, sexo, endereço residencial, profissão, evolução, causas das lesões e uso de antimicrobianos foram obtidos dos pacientes atendidos através da aplicação de um questionário (Anexo II). Foram utilizados critérios de inclusão e exclusão: pacientes diabéticos apresentando úlceras infectadas eram incluídos, já pacientes diabéticos com úlceras sem infecção eram excluídos da pesquisa.

Antes da coleta do material (espécime clínico) estes assinaram um termo de consentimento (Anexo II), permitindo assim, a realização do ato. Não foram excluídos da pesquisa aqueles que faziam anteriormente uso de antimicrobianos.

### 3.4 Coleta e Transporte

As lesões foram submetidas a limpeza com solução de cloreto de sódio (soro fisiológico), estas administradas em forma de jatos diretamente sobre a lesão e posterior limpeza com tampão de gaze estéril, preparando assim, o sitio para o debridamento quando necessário. Para o debridamento foi utilizado uma lâmina de bisturi descartável e estéril com intuito de retirar todo o tecido necrosado (quando presente) ou tecido morto que envolvia a lesão. Após esta etapa, submeteu-se a lesão a uma nova lavagem com solução de cloreto de sódio estéril (soro fisiológico), possibilitando assim, a coleta do espécime, presente na base da lesão para posterior análise microbiológica.

Após os procedimentos citados acima, o espécime clínico foi coletado com auxílio de dois "swabs", estéreis e descartáveis. Ambos foram saturados com o material coletado e, imediatamente após a coleta, um foi acondicionado em meio para transporte Stuart (Anexo I)

e o outro em meio para transporte *Cary & Blair* modificado (PRAS) (Anexo I). O tempo decorrido entre a coleta e semeadura não excedeu a duas horas.

### **3.5 Isolamento e Identificação de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Facultativas**

Para o isolamento de bactérias anaeróbias facultativas e aeróbias estritas, foram utilizados meios e procedimentos recomendados por Koneman e col (1997) e Murray e col (1999) (Anexo I).

O "swab" coletado em meio para transporte Stuart foi semeado, em: BHI caldo (Brain Heart Infusion Broth) (DIFCO), Ágar Mac Conkey (DIFCO) e BHI ágar (Brain Heart Infusion agar) (DIFCO) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, com intuito de isolamento primário. Após semeadura, todo este material foi incubado em estufa bacteriológica a 35/ 37°C durante 24 à 48 h.

#### **3.5.1 Identificação de Cocos Gram Positivos**

Após confirmação das características coloniais e morfotintoriais (coloração de Gram Kopeloff-Beerman), e afinidade de crescimento em meios de cultura, foram realizadas provas como: catalase, coagulase em lâmina e tubo, provas da bacitracina, teste do caldo hipercloretado, teste de aglutinação em látex (identificação de estreptococos beta-hemolíticos) com objetivo de identificação dos gêneros e espécies bacterianas (KONEMANN e col., 1997) (Anexo I).

### 3.5.2 Identificação de Bacilos Gram Negativos

Após confirmação das características coloniais e morfotintoriais (coloração de Gram Kopeloff-Beerman), e afinidade de crescimento em meios de cultura, foram realizadas as seguintes provas: Produção de pigmento, atividade de citocromo-oxidase (identificação de bactérias não fermentadoras), crescimento em triple sugar iron ágar (TSI), prova do indol, prova da utilização do citrato, prova da descarboxilação dos aminoácidos arginina, ornitina e lisina, produção de urease, produção de acetil-carbinol (Voges Proskauer), produção de fenilalanina desaminase, prova da motilidade (Anexo I) (KONEMANN e col., 1997).

Quando não foi possível a identificação pela metodologia convencional, a metodologia automatizada (Vitek-Biomerieux) foi utilizada para este fim.

### 3.6 Isolamento e Identificação de Bactérias Anaeróbias Estritas

Paralelamente ao cultivo de bactérias aeróbias e anaeróbias estritas, o outro "swab" coletado em meio *Cary & Blair* modificado (PRAS) foi processado utilizando procedimentos e meios de cultura recomendados por SUMMANEN et al (1993) e SEBALD e PETIT (1994).

O "swab" foi semeado nos seguintes meios de cultura: Brain Heart Infusion ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, hemina (5mg/ml) e menadione (5mg/ml), fenil-etil-álcool/ ágar (PEA), Bacteroides Bile Esculina ágar (BBE) e também em meio líquido Brain Heart Infusion Broth suplementado (BHI) (Anexo I).

Após semeadura do espécime clínico, as placas contendo os meios de cultura, foram acondicionadas imediatamente em jarra de anaerobiose. A atmosfera de anaerobiose foi obtida através do uso de catalisadores de paládio e envelopes geradores de anaerobiose (DIFCO ou PROBAC). Foi utilizada solução de azul de metileno como indicador de

anaerobiose. As placas foram incubadas a 35/37°C durante 05 dias. Após este período as colônias que cresceram foram examinadas ao microscópio estereoscópio e caracterizadas quanto aos seus aspectos macromorfológicos. Todas as colônias morfológicamente distintas foram então repicadas para o meio de cultura líquido (Brian Heart Infusion) suplementado e incubadas a 37°C durante 48hs. O crescimento bacteriano foi utilizado para o teste de metabolismo respiratório, visando a caracterização do microorganismo como anaeróbio estrito. Este teste foi realizado semeando o crescimento em 3 placas contendo ágar sangue, depois incubadas nas seguintes condições respiratórias: aerobiose (atmosfera convencional), microaerofilia (vela) e anaerobiose (jarra Gaspak). O crescimento bacteriano apenas em condições de anaerobiose demonstrou a presença de bactérias anaeróbias estritas. Esfregaços das distintas colônias isoladas foram preparados e corados pelo método de Gram Kopeloff-Beerman.

Algumas características e testes bioquímicos foram utilizados por identificação presuntiva das bactérias anaeróbias (Anexo I).

### **3.7 Estudo do Perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos**

O estudo do perfil de sensibilidade à antimicrobianos foi realizado com 262 cepas isoladas e identificadas, constituídas por bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas.

#### **3.7.1 Antibiograma de Bactérias Anaeróbias Facultativas e Aeróbias Estritas**

Para cada cepa foi realizado um antibiograma utilizando a técnica de difusão em ágar (NCCLS 2000). Com uma alça microbiológica foi tocada a superfície de 4 a 5 colônias bacterianas de aspecto similar, que se desenvolveram bem isoladas no respectivo meio. Após isto o inóculo foi transferido para um tubo contendo 5ml de solução salina ajustando a

turvação para 0,5 da escala Mc Farland (PROBAC), que corresponde a uma quantidade de  $10^8$  ufc/ml. Foi então submergida a esta suspensão bacteriana um "swab" de algodão estéril e antes de retirá-lo foi eliminado todo excesso de líquido, agitando-o contra a parede interna do tubo. Após este procedimento o "swab" foi inoculado à superfície seca do meio de cultura agar Müeller-Hinton contido em uma placa mantido à temperatura ambiente. Com o objetivo de distribuir uniformemente o inóculo, o ágar foi estriado com o "swab" em pelo menos três direções, girando a placa em ângulos de aproximadamente 60 graus após cada estria. Passado este procedimento foi recolocada a tampa na placa e deixada em repouso durante 5 minutos, para secagem do ágar Müeller-Hinton, antes da colocação dos discos de antibióticos. A escolha dos discos obedeceu a critérios estabelecidos pelo manual NCCLS 2000. Os discos de antibióticos foram colocados manualmente sobre a superfície do meio, com auxílio de pinça estéril; estes foram colocados aproximadamente 20mm um do outro e a 15mm da parede da placa evitando assim que as zonas de inibição de crescimento se sobreponham ou se estendam até a margem do ágar. Cada disco foi pressionado à superfície do ágar com a ponta da pinça. Após esta etapa as placas foram incubadas a 35°C em estufa microbiológica por aproximadamente 18/24hs. Após este período, realizou-se a medição do diâmetro da zona de inibição do crescimento ao redor de cada disco de antibiótico, com auxílio de uma régua. Esta medição foi realizada utilizando-se uma fonte de luz refletida observada contra um fundo negro e opaco; os antibiogramas que continham sangue foram observados também com luz refletida porém, as medições foram efetuadas após remoção da tampa da placa.

Cepas de *Staphylococcus aureus* que apresentaram resistência a oxacilina, foram submetidos a uma prova confirmatória de resistência de acordo com o manual NCCLS M2-A7 (2000).

#### • **Confirmação de Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina**

Para verificar uma possível resistência de uma cepa isolada de *Staphylococcus aureus* frente à Oxacilina, o NCCLS (2000), recomenda a triagem pelo método de difusão em ágar e

o teste confirmatório por diluição em ágar. Na técnica de difusão em ágar deve ser utilizado disco de Oxacilina de 1µg e a incubação da placa deve ser de 24hs (e não de 16 a 18hs).

Se o resultado da leitura apresentar um halo de inibição indicando resistência, o teste confirmatório deve ser realizado.

#### • **Método de Detecção e Confirmação de Cepas Resistentes à Oxacilina**

Com o auxílio de uma alça microbiológica tocou-se a superfície das colônias bacterianas. O inóculo foi transferido para um tubo contendo 5ml de solução salina até apresentar a turvação similar a escala 0,5 Mc Farland (PROBAC). Em seguida, foi submergido a esta suspensão um "swab" de algodão estéril e antes de retirá-lo foi eliminado todo excesso de líquido, agitando o mesmo contra a parede interna do tubo. Após este procedimento o "swab" foi inoculado à superfície seca do meio ágar Müeller Hinton com NaCl a 4% mais 6µg/ml de oxacilina. Com objetivo de distribuir uniformemente o inóculo, o ágar foi estriado com o "swab" em uma pequena área da placa (aproximadamente 2,5cm). Passado este procedimento foi recolocada a tampa na placa e deixada em repouso durante 5 minutos para secagem, onde após este tempo a placa foi incubada a 35°C por 24hs.

A presença de crescimento nesse meio indicou presença de gene *Mec A*, conferindo resistência a oxacilina (NCCLS, 2000; OPLUSTIL CP et al., 2000).

#### • **Identificação de *Enterobacteriaceae* Produtoras de ESBL**

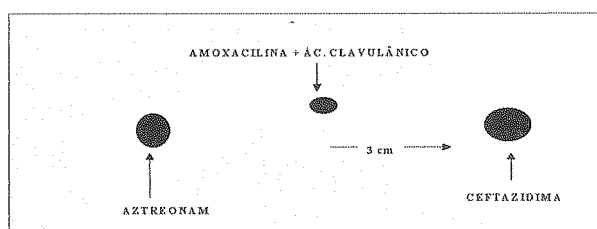
Todas as cepas testadas e que apresentaram, quando analisado o antibiograma, um fenótipo de resistência apresentando resistência à cefalosporinas de terceira geração e sensibilidade às Cefamicinas foram investigadas. O NCCLS (2000) preconiza a realização de



um teste confirmatório. Testes especiais têm sido propostos como: dupla difusão em disco, teste da adição de inibidores de beta-lactamases, o Etest, o teste tridimensional e o cartão VITEK ESBL (NCCLS, 2000).

Nesse estudo, foram realizados os testes de dupla difusão em disco e o cartão VITEK ESBL.

### 1. Dupla Difusão em Disco



Com o auxílio de uma alça microbiológica foi preparado uma suspensão bacteriana de turvação similar à da escala 0,5 Mc Farland (PROBAC). Após visualizada esta turvação foi submergida a esta suspensão um "swab" de algodão estéril e antes de retirá-lo foi eliminado todo excesso de líquido, agitando-o contra a parede do tubo. Após este procedimento o mesmo foi inoculado em placa de ágar Müeller Hinton. Com objetivo de distribuir o inóculo, o ágar foi estriado com o "swab" de uma forma uniforme. Passado este procedimento foi recolocado a tampa da placa e deixada em repouso por 5 minutos para secagem; onde após esta etapa foram colocados manualmente sobre a superfície seca do meio, com auxílio de uma alça estéril os discos de cefalosporinas de terceira geração, Aztreonam e Amoxicilina + Ácido clavulânico a uma distância de 30mm cada.

A produção de ESBL foi detectada em 24 horas de incubação em estufa a 35°C, manifestando uma zona de inibição em forma de "rolha de champagne" (NCCLS, 2000).

## 2. Método de Automação (bioMérieux Vitek, Inc)

Com o auxílio de uma alça microbiológica foi preparado o inóculo. Foram pescadas de 3 a 4 colônias isoladas para o tubo contendo salina, ajustando a turvação no colorímetro 1,0 Mc Farland - azul. Após o ajuste da turvação foi transferido 50 µl do mesmo para o tubo do TSA (teste de sensibilidade a antimicrobianos) através do Módulo I (aspirador/selador). Após esta etapa, foi introduzido o tubo plástico no orifício do cartão GNS-650, onde a suspensão padronizada foi transferida para o interior do cartão. Realizado este procedimento os cartões GNS-650, foram colocados na bandeja e incubados no Modelo II (incubador/leitor).

O tempo de leitura para ESBL foi de mais ou menos 12-18h. O cartão GNS-650 é o cartão específico para a realização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias Gram negativas, este cartão põe a bactéria frente aos seguintes agentes antimicrobianos: Amicacina, Ampicilina, Ampicilina/sulbactam, Aztreonam, Cefepime, Cefotaxima, Cefoxitina, Cefazidima, Cefalotina, Gentamicina, Imipenem, Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina, /Ác. clavulânico, Sulfametoxazol + Trimetoprim e produção de ESBL.

### 3.8 Controle de Qualidade dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos

Cepas padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram utilizadas como controle e testadas cada vez que um novo lote do meio de cultura era preparado.

## 4 RESULTADOS

No presente trabalho 141 pacientes diagnosticados como diabéticos e que apresentavam úlceras infectadas nos pés foram estudados. Destes, 77 pertenciam ao sexo masculino (54,6%) e 64 ao sexo feminino (45,4%) (Tabela 1). Foram então coletados de cada paciente 02 "swabs" para estudo microbiológico. No ato da coleta cada paciente foi submetido a um questionário onde foram colhidas informações sobre sexo, idade, ocupação, taxa glicêmica, tipo de infecção, tipo de lesão e Grau segundo a classificação de Wagner, uso de antimicrobianos, tempo de diabetes e origem das lesões.

**Tabela 1: Distribuição dos pacientes quanto ao sexo**

SEXO	Nº DE PACIENTES	PERCENTUAL
Masculino	77	54,6%
Feminino	64	45,4%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

A faixa etária mais freqüente foi a de pacientes com idade entre 51 a 60 anos (32,6%) (Tabela 2). A ocupação que apresentou uma maior distribuição, compreendendo 67 pacientes (47,5%) (Tabela 4) foi a dos aposentados.

**Tabela 2: Distribuição dos pacientes quanto à faixa etária**

FAIXA ETÁRIA	Nº DE PACIENTES	PERCENTUAL
20 - 30	01	0,7%
31 - 40	07	5,0%
41 - 50	14	9,9%
51 - 60	46	32,6%
61 - 70	40	28,4%
71 - 80	25	17,7%
81 - 90	08	5,7%
<b>Total</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

**Tabela 4: Distribuição dos pacientes quanto à ocupação**

PROFISSÃO	Nº DE PACIENTES	PERCENTUAL
Aposentado	67	47,5%
Outras	36	25,6%
Doméstica	27	19,1%
Comerciante	11	7,8%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

Foi verificado que 106 pacientes (75,1%) residiam em Fortaleza e apenas 29 pacientes (20,6%) eram do interior do Estado (Tabela 3).

**Tabela 3: Distribuição dos pacientes quanto à procedência**

PROCEDÊNCIA	Nº DE PACIENTES	PERCENTUAL
Fortaleza	106	75,1%
Região Metropolitana	06	4,2%
Interior do estado	29	20,7%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

O tempo de diabetes, é um ponto muito preocupante, haja vista que as complicações começam a surgir com o passar dos anos. Sobre este tempo foi verificado que 90 (63,8%) dos pacientes pesquisados apresentaram um tempo de duração do diabetes entre 1 e 10 anos (Tabela 5).

**Tabela 5: Distribuição dos pacientes quanto à duração do diabetes**

TEMPO DE DIABETES	Nº DE PACIENTES	PERCENTUAL
01 - 10 anos	90	63,8%
11 - 20 anos	41	29,1%
21 - 30 anos	07	4,9%
Acima de 30 anos	03	2,2%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

Com relação à taxa glicêmica, foi verificado que 43,3% dos pacientes apresentaram valores nos intervalos entre 201-300mg/dl (43,3%) (Tabela 6).

**Tabela 6: Distribuição da taxa glicêmica dos pacientes estudados**

<b>TAXA GLICÊMICA</b>	<b>N° DE PACIENTES</b>	<b>PERCENTUAL</b>
100 - 200	42	29,9%
201 - 300	61	43,3%
301 - 400	27	19,1%
401 - 500	07	4,9%
501 - 600	04	2,8%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

Quanto à origem da lesão; 35,0% (49) dos pacientes relatou que a úlcera foi originada de um trauma. Vale ressaltar que 33,0% (47) não souberam informar como ocorreu a formação de sua lesão (Tabela 7).

**Tabela 7: Distribuição dos pacientes quanto à origem da lesão**

<b>ORIGEM DA LESÃO</b>	<b>N° DE PACIENTES</b>	<b>PERCENTUAL</b>
Trauma	49	35,0%
Calo	35	25,0%
Não sabe informar	47	33,0%
Outras causas	10	7,0%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

Na tabela 8 pode ser verificado que a infecção foi polimicrobiana em 69,5% dos pacientes estudados.

**Tabela 8: Distribuição dos pacientes quanto ao tipo de infecção**

<b>TIPO DE INFECÇÃO</b>	<b>Nº DE PACIENTES</b>	<b>PERCENTUAL</b>
Polimicrobiana	98	69,5%
Monomicrobiana	43	30,5%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

Todos os pacientes que participaram da pesquisa apresentaram lesões nos membros inferiores e estas lesões foram classificadas quanto ao tipo de Grau apresentado. A classificação padronizada foi a de Wagner. Com relação a (Tabela 9), observamos que foram classificadas na lesão de Grau II um total de 62 (44,0%) pacientes e na de Grau V apenas 04 pacientes.

**Tabela 9: Distribuição dos pacientes quanto à classificação de Wagner**

GRAU	N° DE PACIENTES	PERCENTUAL
0	00	0,0%
I	32	22,7%
II	62	44,0%
III	29	20,6%
IV	14	9,9%
V	04	2,8%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>

Com relação ao uso de agentes antimicrobianos no ato do exame, verificamos que 91 dos pacientes estudados (64,5%) não faziam (Tabela 10).

**Tabela 10: Distribuição dos pacientes que faziam uso de antimicrobianos**

ANTIMICROBIANOS	N° DE PACIENTES	PERCENTUAL
Não	91	64,5%
Sim	50	35,5%
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>	<b>100,0%</b>



**Tabela 11: Espécies bacterianas isoladas de úlceras infectadas em 141 pacientes diabéticos**

<b>Grupos Bacterianos</b>	<b>N° de Bactérias Isoladas</b>	<b>Percentual</b>
<b>Aeróbias e Anaeróbias Facultativas</b>		
<b>Bacilos Gram Negativos</b>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	11,1%
<i>Morganella morgani</i>	31	10,4%
<i>Escherichia coli</i>	24	8,1%
<i>Proteus mirabilis</i>	23	7,7%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	7,0%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	3,4%
<i>Enterobacter cloacae</i>	08	2,7%
<i>Enterobacter gergoviae</i>	05	1,7%
<i>Proteus vulgaris</i>	05	1,7%
<i>Citrobacter diversus</i>	03	1,0%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	03	1,0%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	03	1,0%
<i>Serratia liquefaciens</i>	02	0,7%
<i>Serratia marcescens</i>	02	0,7%
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	01	0,3%
<i>Citrobacter freundii</i>	01	0,3%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	01	0,3%
<i>Serratia odorifera</i>	01	0,3%
<b>SUBTOTAL</b>	<b>177</b>	<b>59,4%</b>
<b>Cocos Gram Positivos</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	61	20,4%
<i>Enterococcus</i> sp	11	3,7%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	11	3,7%
<i>Streptococcus</i> sp*	02	0,7%
<b>SUBTOTAL</b>	<b>85</b>	<b>28,5%</b>
<b>Anaeróbias Estritas</b>		
<i>Bacteroides</i> do grupo <i>fragilis</i>	10	3,4%
<i>Peptostreptococcus</i> sp	09	3,0%
Bacilos Gram(-)	08	2,7%
Bacilos Gram (-) pigmentados	08	2,7%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	01	0,3%
<b>SUBTOTAL</b>	<b>36</b>	<b>12,1%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>298</b>	<b>100,0%</b>

\*Beta hemolítico do grupo G de Lancefield

#### 4.1 Estudo microbiológico

Foram isoladas 298 cepas bacterianas das 141 úlceras infectadas distribuídas da seguinte forma: 177 bacilos Gram negativos (59,4%), 85 cocos Gram positivos (28,5%) e 36 anaeróbios estritos (12,1%) (Tabela 11).

Dos bacilos Gram negativos as espécies que apresentaram maior frequência em ordem decrescente foram : *Klebsiella pneumoniae* com 33 cepas (11,1%), *Morganella morganii* com 31 cepas (10,4%), *Escherichia coli* com 24 cepas (8,1%) e *Proteus mirabilis* com 23 cepas (7,7%). Dentre os bacilos não fermentadores a única espécie isolada foi a *Pseudomonas aeruginosa* com 21 cepas (7,0%) (Tabela 11).

Dos cocos Gram positivos a espécie mais frequentemente isolada foi *Staphylococcus aureus* com 61 cepas (20,4%) do total, seguida de *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus* sp com 11 cepas (3,7%) respectivamente (Tabela 11).

Quanto aos anaeróbios estritos os mais comumente isolados foram: *Bacteroides fragilis* com 10 cepas (3,4%), seguida de *Peptostreptococcus* sp com 09 cepas (3,0%) (Tabela 11).

No quadro 2 estão distribuídas as espécies ou grupos bacterianos isolados por paciente. Em ordem decrescente de frequência foi verificado que as enterobactérias foram prevalentes e isoladas de 118 pacientes (83,7%). Em seguida foram isoladas *Staphylococcus aureus* em 43,3% dos pacientes, bactérias anaeróbias estritas em 17,0%, *Pseudomonas aeruginosa* em 14,9% e por último *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus* sp em 7,8% dos pacientes respectivamente.

**Quadro 2: Espécies e/ou grupos bacterianos isolados de 141 pacientes**

BACTÉRIAS / GRUPOS BACTERIANOS	N°	PERCENTUAL
Enterobactérias	118	83,7%
<i>Staphylococcus aureus</i>	61	43,3%
Bactérias anaeróbias estritas	24	17,0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	14,9%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	11	7,8%
<i>Enterococcus sp</i>	11	7,8%

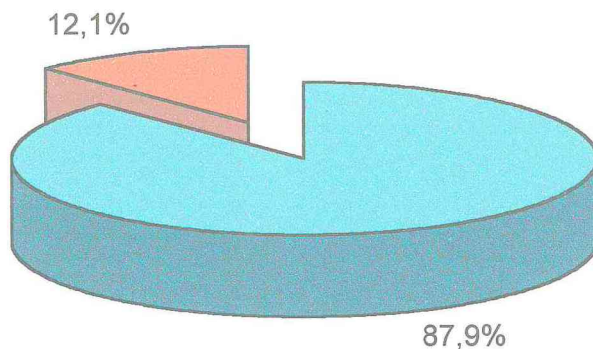
**Quadro 3: Espécies e/ou grupos bacterianos isolados de 141 diferentes tipos de úlceras segundo a classificação de Wagner**

BACTÉRIAS E OU GRUPOS BACTERIANOS	PERCENTUAL				
	CLASSIFICAÇÃO DE WAGNER				
	I	II	III	IV	V
Enterobactérias	65,7%	85,5%	89,7%	100%	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	46,9%	56,4%	20,7%	21,4%	50%
Bactérias anaeróbias estritas	0,0%	0,0%	34,5%	71,4%	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,0%	0,0%	41,4%	57,1%	25%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3,6%	0,0%	8,9%	0,0%	0,0%
<i>Enterococcus sp</i>	0,0%	3,8%	6,7%	0,0%	0,0%

O quadro 3 descreve a participação das espécies e ou grupos bacterianos nos diferentes tipos de úlceras. Observamos que o grupo das enterobactérias no geral, foi o mais freqüente. A espécie *Staphylococcus aureus*, foi mais freqüente nas úlceras de Graus II e V. Organismos anaeróbios estritos foram isolados de todas as úlceras de Grau V; destacamos também a participação de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* em 57,1% das úlceras de Grau IV. As espécies *Enterococcus sp* e *Streptococcus pyogenes* foram mais isoladas nas úlceras de Grau I e II.

No gráfico 1 pode ser observado que 262 cepas bacterianas isoladas pertenciam ao grupo de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas (87,9%) e apenas 36 cepas pertenciam ao grupo das anaeróbicas estritas (12,1%) (Gráfico 1).

**GRÁFICO 1: Percentual de bactérias isoladas quanto ao grupo**



■ Aeróbicas e Anaeróbicas Facultativas ■ Anaeróbicas Estritas

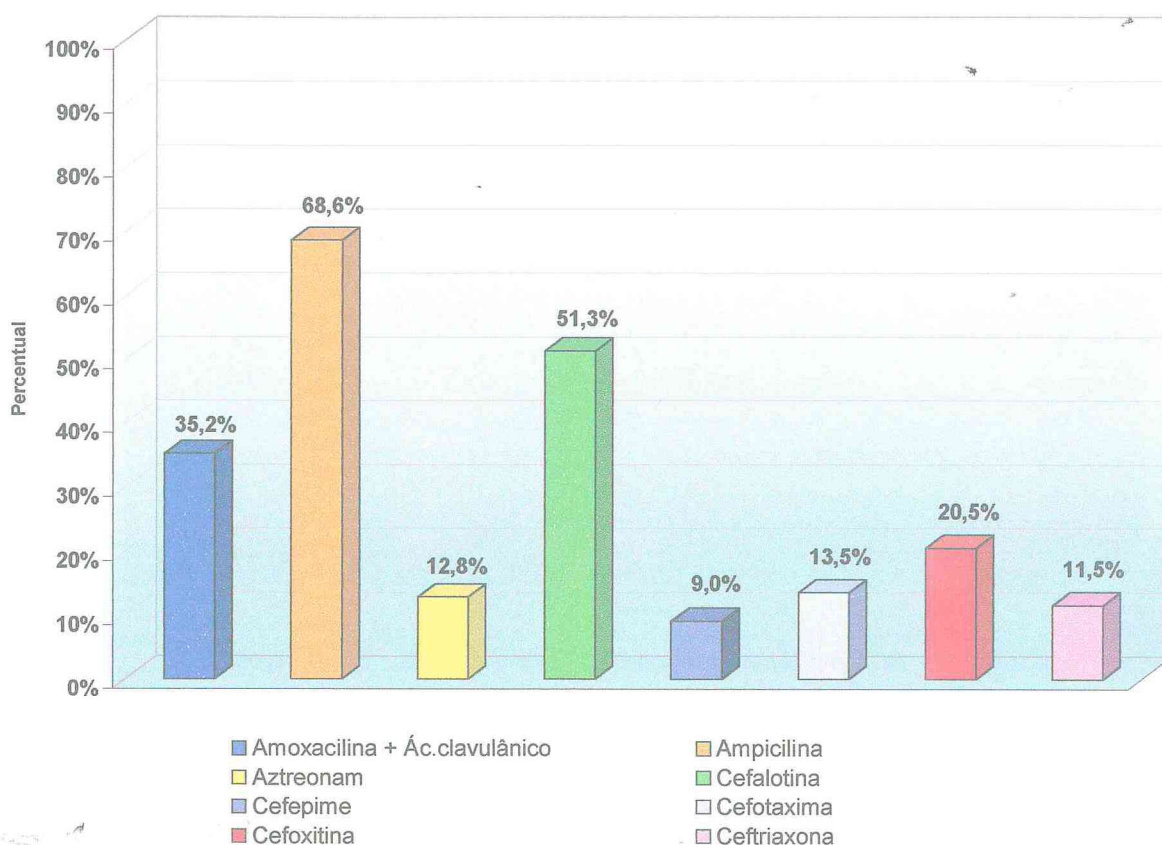
#### 4.2 Estudo do perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos

Analisando o perfil de resistência à antimicrobianos das cepas isoladas obtivemos os seguintes resultados:

Das 156 cepas de enterobactérias isoladas e submetidas a um teste de sensibilidade à antimicrobianos da classe dos Beta-Lactâmicos, observamos que ocorreu uma maior resistência à Ampicilina 107 cepas (68,6%), e as cefalosporinas de primeira geração com 80 cepas (51,3%) resistentes. Observamos também que 55 cepas (35,2%) foram resistentes à associação beta-lactâmico + inibidor de beta-lactamase, 32 cepas (20,5%) apresentaram

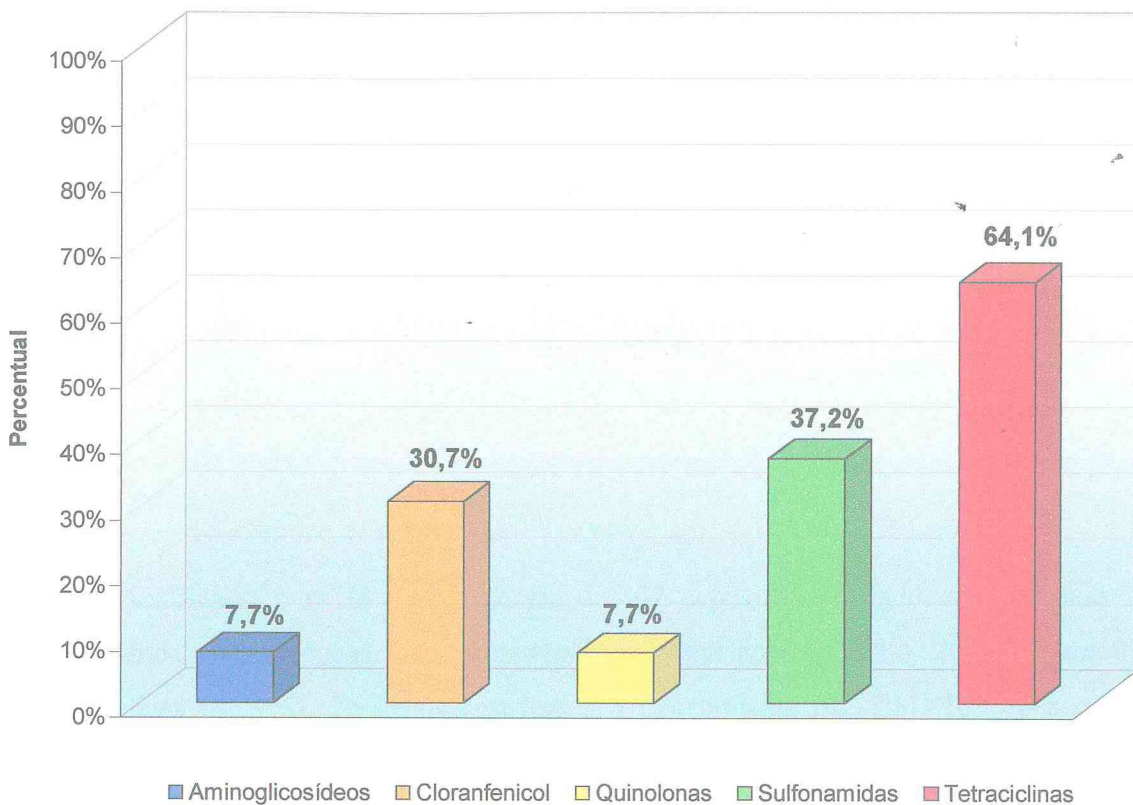
percentual de resistência moderado a cefalosporina de segunda geração; 21 cepas (13,5%) apresentaram resistência a uma cefalosporina de terceira geração e apenas 14 cepas (9,0%) apresentaram resistência a uma cefalosporina de quarta geração (Gráfico 2).

**GRÁFICO 2: Perfil de resistência aos beta-lactâmicos de 156 cepas de enterobactérias**



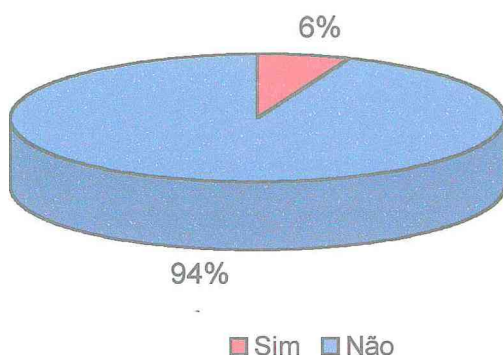
No gráfico 3 pode ser verificado que, 100 cepas apresentaram resistência à Tetraciclina (64,1%), 58 cepas foram resistentes as Sulfonamidas (37,2%), 48 cepas (30,7%) apresentaram resistência ao Cloranfenicol e apenas 12 cepas (7,7%) apresentaram resistência as quinolonas e aminoglicosídeos respectivamente.

**GRÁFICO 3: Percentual de resistência a antimicrobiano de 156 cepas de enterobactérias**



Das 156 cepas de enterobactérias, foram isoladas de 10 pacientes 07 cepas de *Klebsiella pneumoniae* e 03 cepas de *Escherichia coli* que apresentavam padrão fenotípico de cepas produtoras de ESBL (Gráfico 4). Quatro destes pacientes haviam sido internados há aproximadamente 30 dias; cinco destes já faziam uso de agentes antimicrobianos (cefalosporinas e Ampicilinas) já há aproximadamente 30 dias; e apenas um paciente apresentava lesão recente isto é; com apenas 10 dias de evolução e não fazia uso de agentes antimicrobianos antes da coleta do espécime. Constatamos ainda com relação a estas 10 cepas produtoras de ESBL que 09 cepas apresentaram uma boa sensibilidade aos aminoglicosídeos, quinolonas. Todas as 10 cepas apresentaram sensibilidade ao Imipenem.

**GRÁFICO 4: Percentual de enterobactérias que apresentam beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)**



Analisando o perfil de resistência das 61 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas, constatamos que 53 cepas foram resistentes as Penicilinas (86,9%), 28 cepas resistentes as Tetraciclinas (45,9%), 26 cepas resistentes à Eritromicina (42,6%), 13 cepas resistentes à Rifampicina (21,3%), 12 cepas resistentes ao Cloranfenicol (19,7%) e 10 cepas resistentes ao Sulfametoxazol + Trimetoprim (16,4%), valendo ressaltar que apenas 07 cepas (11,5%) apresentaram resistência à Oxacilina e nenhuma das 61 cepas isoladas apresentou resistência à Vancomicina (Gráfico 5 e 6).



**GRÁFICO 5:** Percentual de resistência a antimicrobianos de 61 Cepas de *Staphylococcus aureus*

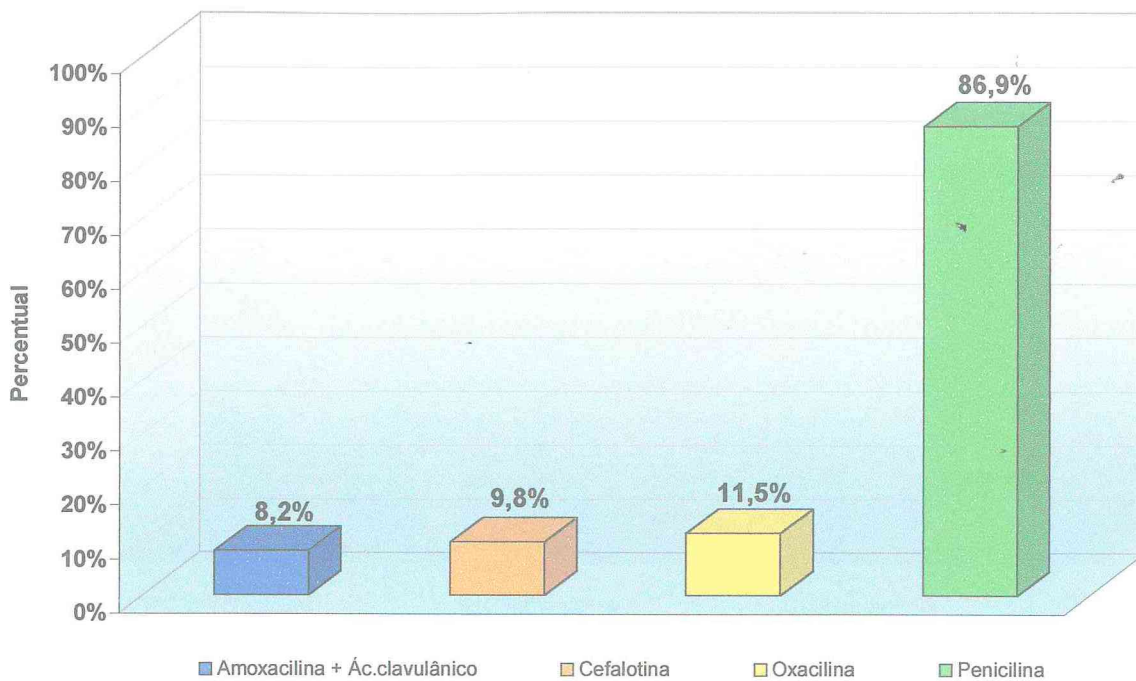
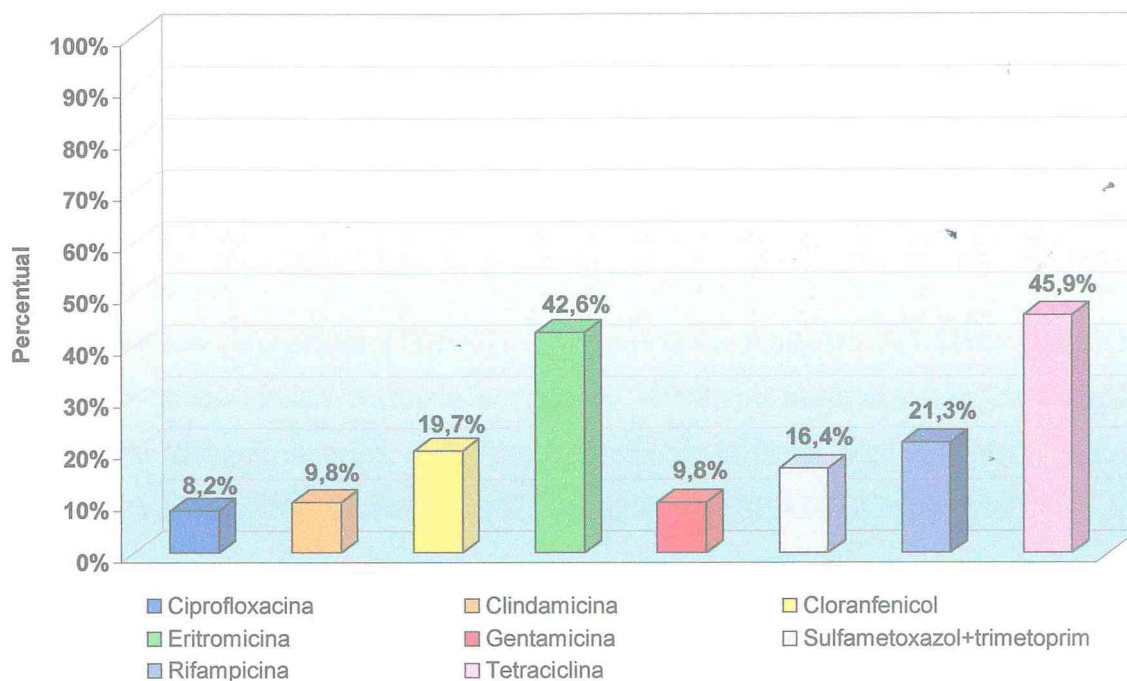


GRÁFICO 6: Percentual de resistência de resistência a antimicrobianos de 61 cepas de *Staphylococcus aureus*



Com relação às cepas de *Pseudomonas aeruginosas* isoladas (21) obtivemos os seguintes resultados: alta resistência à Sulfametoxazol + Trimetoprim (95,2%), e Cloranfenicol (90,5%), 07 resistência à Ceftriaxona e Aztreonam em 33,3% das cepas respectivamente, e resistência à Gentamicina e Cefepime em 23,8% respectivamente, 04 cepas apresentaram resistentes à Ceftazidima, Netilmicina, Tobramicina respectivamente (19,0%), 03 resistentes à Amicacina e Cefoperazona respectivamente (14,3%).

Das 11 cepas de *Enterococcus* sp testadas, todas apresentaram sensibilidade à Penicilina, Ampicilina e Vancomicina.

## 5 DISCUSSÃO

O pé diabético constitui uma complicação multifacetada do Diabetes Mellitus. Neste trabalho foram analisadas 141 úlceras infectadas de pacientes com Diabetes Mellitus do tipo-2.

Ao analisarmos a prevalência quanto ao sexo constatamos que não houve uma diferença significativa nesse estudo. Estudos multicêntricos feitos no Brasil, mostraram igual prevalência de Diabetes Mellitus tipo-2 entre homens e mulheres (MALERBI et al, 1992). Já Baley *et al*, em estudo realizado no hospital Mount Sinai, em 1983, com 112 pacientes, obteve uma prevalência de homens (77-69%), com relação a mulheres (35-31%) (BALEY et al 1985). Em estudo similar realizado no ano de 1998, no hospital escola da Faculdade de Medicina do triângulo mineiro, com 70 pacientes com Diabetes Mellitus tipo-2, Beatriz *et al* encontraram 37 (52,9%) homens e 33 (47,1%) mulheres (BEATRIZ et al, 1999).

Com relação à idade dos pacientes estudados encontramos em nosso estudo um predomínio de pacientes na faixa etária compreendida entre a quinta e sétima década. PARISH em estudo realizado com 40 pacientes em 1996, mostraram que a média de idade em que o paciente diabético apresenta distúrbios nos pés está entre 40 a 80 anos (PARISH *apud* KOZAK 1996).

Analisando a ocupação, observamos que a prevalência de lesões nas extremidades foi encontrada em maior proporção nos aposentados, haja vista, que é a condição em que se encontra a maioria da população com idade entre 50 e 80 anos. A maioria destes pacientes (75,1%) era proveniente de Fortaleza. Interessante observar que 20,7 % dos pacientes vieram do interior do Estado para tratamento no Centro. Como foi observado, muitos pacientes são atendidos em outras unidades de tratamento não especializadas e não obtém sucesso, quando então são drenadas para o Centro. Tratando-se do único Centro especializado do Estado, a necessidade de ampliação do atendimento bem como da instalação de laboratório para diagnóstico desses processos infecciosos fez-se notar.

O tempo de duração do diabetes é um ponto indicativo de gravidade e surgimento de úlceras, isto é, à medida que os anos passam o paciente com Diabetes Mellitus tipo-2 tende a ter uma maior propensão a manifesta-las. Alguns autores relatam o aparecimento de lesões de membros inferiores dentro de um tempo médio de duração da doença que vai de 11 a 20 anos (SPICHLER, 1998). Entretanto, o tempo real de duração da doença é fator de controvérsia. Segundo Harris *et al* (1992), alguns pacientes com Diabetes Mellitus tipo-2 podem permanecer por 10 anos ou até mais tempo com a doença antes de ser feito o diagnóstico pelo aparecimento dos sintomas habituais. Isto explicaria muitos casos cuja primeira manifestação é o aparecimento de uma complicação crônica. Neste estudo, o intervalo de tempo de diabetes que prevaleceu foi o intervalo compreendido entre 1 e 10 anos. Estudo publicado por Beatriz *et al* em 1999, constataram que as lesões foram mais freqüentes nos pacientes com mais de 5 anos de diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo-2.

O controle glicêmico em pacientes com Diabetes Mellitus tipo-2 é importante pois, a glicemia aumentada é um fator que predispõe as complicações crônicas comum a esta doença (SKYLER *et al*, 1998). Estudos realizados por Leibovici *et al*, em 1996, com 132 pacientes diabéticos apresentando lesões infectadas de membros inferiores mostraram que, 65 (49,2%) mantinham taxas glicêmicas acima da média de normalidade. Estudos realizados no Japão, definiram a importância do controle glicêmico no desenvolvimento da prevenção primária e progressão (intervenção secundária) de complicações microvasculares em pacientes diabéticos insulino-dependentes do tipo-2 (OHKUBO *et al*, 1995). Neste estudo, a avaliação glicêmica foi realizada tomando-se as últimas três dosagens de glicemia plasmática realizada nos últimos 12 meses, valores constavam no prontuário de cada paciente. Foi verificado que as taxas mais freqüentes compreenderam os valores entre 201-300mg/dl. O diabetes mal controlado está associado a elevação do risco e progressão das complicações crônicas. A hiperglicemia causa glicosilação do colágeno, tornando as calosidades rígidas e inflexíveis, as quais podem agir como corpo estranho e causar úlceras e rachaduras na pele (CAMPBELL *et al.*, 1995).

A neuropatia sensitivo-motora e autonômica e a doença vascular periférica são as duas principais complicações crônicas envolvidas na gênese do pé diabético. A neuropatia concorre com a perda gradual da sensibilidade dolorosa, deformidades e alterações microcirculatórias

características, constituindo-se no mais importante fator permissivo para o estabelecimento do pé em risco o qual evolui freqüentemente para a formação de ulcerações (HERMELINDA, 1997). A neuropatia tem sido um fator de risco muito importante para o desenvolvimento de ulcerações nos membros inferiores, e está presente em mais de 80% dos pacientes com Diabetes Mellitus tipo-2 (BOULTON, 1988; LIPSKY et al, 1990; CAPUTO et al, 1996). Sabendo do grau de importância que estas formas patológicas degenerativas tem é que avaliamos a origem das lesões de cada paciente envolvido neste estudo, e constatamos que o trauma foi a forma mais freqüente. É importante ressaltar que 33,0% dos pacientes entrevistados disseram desconhecer a origem da lesão e muitas vezes não sabiam precisar o tempo de evolução da mesma. Este achado pode ser compreendido pelo fato destes pacientes apresentarem neuropatia sensitivo-motora com perda de sensibilidade. Assim, lesões ocorrem ou pequenas fissuras que são portas de entrada para infecções e não são percebidas pelos pacientes. Aliada a esta questão, existe também a rejeição e o desconhecimento do paciente com relação a sua doença e aos cuidados relativos aos pés.

Abbott e cols, em 1998, estudando uma grande população diabética com neuropatia estabelecida, sem doença vascular periférica ou lesão prévia associada, determinaram que a prevalência anual de uma primeira ulceração em membros inferiores é de 7,2%.

Sabendo que a úlcera é a porta de entrada para o início de um processo infeccioso no pé diabético é que se viu a necessidade de classifica-las quanto a sua gravidade. A classificação utilizada neste estudo foi a de Wagner publicada em 1984. Como todos os pacientes utilizados na pesquisa eram pacientes ambulatoriais, obtivemos poucos apresentando um Grau mais agravante como as de Grau V com 2,8% de prevalência. O Grau de Wagner mais freqüentemente encontrado neste estudo foi o Grau II, compreendendo 62 (44,0 %) de todas as úlceras onde destas 17 (27,4%) apresentaram infecções do tipo monomicrobianas e 45 (72,6%) do tipo polimicrobiana. Observamos neste estudo que o grupo das enterobactérias foi o mais isolado. Já a espécie de *Staphylococcus aureus* ocorreu com uma maior freqüência nas úlceras de Grau II e V.

O tipo de infecção que predominou nesse estudo foi a do tipo polimicrobiana com 98 (69,5%), confirmando o que já vem sendo citado por alguns autores em pesquisas. Estudos publicados por Sapico *et al* em 1984 envolvendo 32 pacientes diabéticos com lesões de

membros inferiores, mostraram que 25 (71%) destes pacientes apresentaram infecções do tipo polimicrobiana. West *et al*, em pesquisa publicada em 1995 mostraram que 60% das infecções que envolviam o pé diabético eram classificadas como polimicrobianas. Alguns autores relatam de 2 a 6 patógenos isolados por paciente (LIPSKY *et al*, 1990; WEST *et al*, 1995; GRAYSON *et al*, 1995).

O uso de agentes antimicrobianos antes da coleta do espécime clínico, foi avaliado e observamos que 50 pacientes (35,5%) faziam uso de agentes antimicrobianos ou haviam feito nos últimos 30 dias.

Com relação à coleta do espécime clínico, utilizamos os procedimentos recomendados por STUART *et al* (1995) e SAPICO *et al* (1984). Segundo Dale (1995), o procedimento para obtenção do espécime clínico para cultura de úlceras infectadas ainda permanece em debate. O material pode ser coletado com “swab” após limpeza e debridamento da lesão, curetagem da base da úlcera ou por aspiração com seringa. Segundo Wheat *et al* (1986) a coleta utilizando “swab” ou através de curetagem da lesão proporcionam melhor rendimento no que diz respeito ao maior número de isolamento bacteriano do que a coleta realizada por aspiração, quando as lesões são superficiais ou profundas, com celulite, mas sem abscesso. Stuart *et al* (1995) realizaram estudo comparativo entre dois tipos de coleta objetivando o isolamento de bactérias anaeróbias estritas de úlceras infectadas em pacientes diabéticos: a coleta utilizando “swab” foi realizada após limpeza da lesão com acondicionamento em meio para transporte anaeróbio e a coleta por aspiração com seringa. Todos os dois métodos foram aplicados em 43 pacientes diabéticos com úlceras infectadas. Os autores concluíram que bactérias anaeróbias estritas foram isoladas com maior frequência quando o espécime clínico foi coletado utilizando-se o “swab”.

Com relação ao perfil microbiológico obtivemos neste estudo os seguintes resultados; quanto ao isolamento de bactérias anaeróbias facultativas: foram isolados 177 bacilos Gram negativos e 85 cocos Gram positivos. A espécie mais frequente foi o *Staphylococcus aureus*. Já o grupo bacteriano que prevaleceu foi o dos bacilos Gram negativos, destacando entre estes a família *Enterobacteriaceae*. As cepas de enterobactérias foram isoladas de 83,7% dos pacientes e as de *Staphylococcus aureus* de 43,3% dos pacientes.

As enterobactérias são importantes bactérias que predominam na microbiota intestinal humana e são encontradas comumente associadas a infecções na comunidade e principalmente em infecções hospitalares. Segundo Dale (1995), em pacientes diabéticos com úlceras infectadas não complicadas, que não estão fazendo uso de antimicrobianos, as características microbiológicas são: isolamento predominante de cocos Gram positivos em cerca de 90% das lesões. *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp estão presentes em cerca de 23% dos espécimes clínicos. Neste estudo, o isolamento de enterobactérias em 83,7% dos pacientes nos surpreendeu. Um dos fatores que pode ter concorrido para este achado foi o uso de antimicrobianos relatado por 35,5% dos pacientes estudados. Muitos destes pacientes que relataram uso recente de antimicrobianos haviam também sofrido internamentos em unidades hospitalares e portanto pode ter ocorrido colonização por cepas daquele ambiente. Feldmeier *et al* (2002), em estudo realizado na favela Serviluz, em Fortaleza, em pacientes com infecção severa secundária à tungiase relataram o achado não esperado de enterobactérias nas lesões desses pacientes. Eles relacionam a falta de escolaridade e de condições de higiene do grupo estudado para o achado dessas bactérias, principalmente *Escherichia coli* em lesões de pele.

As enterobactérias isoladas neste estudo mostraram uma alta percentagem de resistência para Ampicilina, Tetraciclina, cefalosporinas de primeira geração, Sulfametoxazol + Trimetoprim e Amoxicilina + Ácido Clavulânico. O que causou surpresa neste estudo foi o achado de 10 cepas de enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Infelizmente a resistência entre bactérias Gram negativas tem sido cada vez mais comum, tornando as decisões mais difíceis quando se tem de escolher uma determinada terapia. Organismos Gram negativos tem desenvolvido resistência ampla a antimicrobianos do grupo das cefalosporinas e Penicilinas (DIEKEMA *et al.*, 1999). Estas resistências são mediadas por beta lactamases de espectro estendido, mais comumente presentes em cepas de *Escherichia coli* e espécies de *Klebsiella* sp. (CARS *et al*, 2001).

As betas lactamases de espectro estendido como a TEM-1, TEM-2 e SHV-1, são enzimas presentes em bactérias resultantes de processos mutacionais, estas normalmente estão localizadas nos plasmídios bacterianos, que carregam os gens responsáveis pela resistência para outra droga antimicrobiana, causando sérias dificuldades no tratamento de infecções (LIVERMORE *et al.*, 1995).

O surgimento de plasmídeos mediadores de beta lactamases de espectro estendido (ESBL) em membros da família *Enterobacteriaceae*, tornou-se um problema mundialmente crescente (YAN et al., 2000; PIROTH et al., 1998; SIROT et al., 1992).

Na França, em pesquisa realizada em 1990, 14,1% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de 12 hospitais universitários apresentavam resistência à Cefotaxima. Em uma pesquisa hospitalar foram constatados que 51% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas também produziam ESBL (SIROT et al., 1992). Nos Estados Unidos, o programa de vigilância nacional de infecções nosocomiais notificou que 5% da resistência desenvolvida à Cefotaxidima no ano de 1991, estava associado a produção de ESBL. Inicialmente estas cepas de enterobactérias produtoras de ESBL, foram encontradas na costa leste e oeste e na região de Chicago. Cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL estão hoje espalhadas por todo o país (LIVERMORE, 1995). Estudos realizados em hospital universitário na cidade de Taiwan no ano de 1999, obtiveram de um total de 1210 isolados clínicos de *Escherichia coli* uma prevalência de cepas produtoras de ESBL na ordem de 1,6% do total de isolados; abaixo do que foi notificado no Japão (2,9 a 8,0%) (YAN et al., 2000).

Até 1998, não havia nenhuma informação sobre cepas produtoras de ESBLs na América do Sul (GUZMÁN-BLANCO et al., 2000). Em 1997, o programa Sentry de vigilância epidemiológica de resistência à antimicrobianos, analisou cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de hemoculturas e constatou que havia uma variação entre os países do cone sul a respeito dos percentuais de isolamento. Entre isolados de *Escherichia coli* os percentuais de isolamento obtido foram: Uruguai (4,5%), Chile e México (12%). Já entre isolados de *Klebsiella pneumoniae*: México (31%) e Brasil (56,6%) (DIEKEMA et al., 1999; TENOVER et al., 1996, 1999).

Em 1998, estudos multicêntricos conduzidos pelo programa Sentry, obtiveram os seguintes resultados, de 20 laboratórios clínicos e 36 hospitais localizados em diferentes regiões do Brasil; 855 cepas isoladas foram avaliadas incluindo 591 enterobactérias; dentre as enterobactérias as duas cepas mais frequentes foram *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* 13,6% (*Escherichia coli*) e 42,1% (*Klebsiella pneumoniae*), eram produtoras de ESBL (SADER et al., 2000; GALES et al., 1997).



Neste estudo, a prevalência de cepas produtoras de ESBL foi da ordem de 6%, isto é, 10 pacientes. Destes apenas um paciente apresentava lesão recente com aproximadamente 10 dias de evolução e não relatava uso de antimicrobianos. O que é um achado preocupante visto que estas cepas são predominantemente hospitalares.

Considerado mundialmente um dos maiores problemas de saúde pública, a resistência a antimicrobianos tem alcançado no Brasil, como em outros países, índices alarmantes. Embora, este seja, na maioria das vezes, resultado do uso abusivo de antimicrobianos, há crescente evidência que seu aumento seja também resultante da utilização na medicina veterinária e na agricultura (SADER et al., 2000). Estudos revelam uma associação existente entre o consumo abusivo de agentes antimicrobianos pela população contribuindo com o desenvolvimento de resistência (ENNE et al., 2001).

Cars *et al.*, (2001), compararam o uso de agentes antimicrobianos fora do ambiente hospitalar em 15 países que compunham a união europeia em 1997, e verificaram que 11 destes 15 países, utilizavam Penicilinas de amplo espectro. Dados da venda de antimicrobianos não são publicamente disponíveis em muitos países, incluindo o Brasil. Segundo Hart *et al.*, (1998), ainda não está claro a diferença de resistência desenvolvida por bacilos Gram negativos em diferentes países da América Latina; razões podem incluir diferenças quanto ao uso de agentes antimicrobianos, prática no controle de infecções, clima e outros fatores.

*Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose, que desempenham importante papel nas infecções nosocomiais. Estas bactérias são comumente isoladas de pacientes com pneumonias em hospitais da América Latina (SADER et al., 1998). Em geral, cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam uma boa susceptibilidade frente aos carbapenêmicos, Amicacina, Imipenem, Cefepime, Ceftazidima (DIEKEMA et al., 1999; SADER et al., 1998). Dentre os não fermentadores a única espécie isolada foi a *Pseudomonas aeruginosa* em 14,9% dos pacientes. Esta espécie bacteriana tem sido isolada de úlceras infectadas graves e profundas muitas vezes em pacientes com osteomielite (HART et al., 1998).

Neste estudo, a prevalência de cepas produtoras de ESBL foi da ordem de 6%, isto é, 10 pacientes. Destes apenas um paciente apresentava lesão recente com aproximadamente 10 dias de evolução e não relatava uso de antimicrobianos. O que é um achado preocupante visto que estas cepas são predominantemente hospitalares.

Considerado mundialmente um dos maiores problemas de saúde pública, a resistência a antimicrobianos tem alcançado no Brasil, como em outros países, índices alarmantes. Embora, este seja, na maioria das vezes, resultado do uso abusivo de antimicrobianos, há crescente evidência que seu aumento seja também resultante da utilização na medicina veterinária e na agricultura (SADER et al., 2000). Estudos revelam uma associação existente entre o consumo abusivo de agentes antimicrobianos pela população contribuindo com o desenvolvimento de resistência (ENNE et al., 2001).

Cars *et al.*, (2001), compararam o uso de agentes antimicrobianos fora do ambiente hospitalar em 15 países que compunham a união européia em 1997, e verificaram que 11 destes 15 países, utilizavam Penicilinas de amplo espectro. Dados da venda de antimicrobianos não são publicamente disponíveis em muitos países, incluindo o Brasil. Segundo Hart *et al.*, (1998), ainda não está claro a diferença de resistência desenvolvida por bacilos Gram negativos em diferentes países da América Latina; razões podem incluir diferenças quanto ao uso de agentes antimicrobianos, prática no controle de infecções, clima e outros fatores.

*Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose, que desempenham importante papel nas infecções nosocomiais. Estas bactérias são comumente isoladas de pacientes com pneumonias em hospitais da América Latina (SADER et al., 1998). Em geral, cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam uma boa susceptibilidade frente aos carbapenêmicos, Amicacina, Imipenem, Cefepime, Ceftazidima (DIEKEMA et al., 1999; SADER et al., 1998). Dentre os não fermentadores a única espécie isolada foi a *Pseudomonas aeruginosa* em 14,9% dos pacientes. Esta espécie bacteriana tem sido isolada de úlceras infectadas graves e profundas muitas vezes em pacientes com osteomielite (HART et al., 1998).

Dentre os cocos Gram positivos, o *Staphylococcus aureus* foi a espécie mais freqüentemente isolada neste estudo (43,3% dos pacientes).

O *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, é um problema crônico presente em hospitais da América Latina. Dados do programa Sentry revelam que 30% à 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de hospitais apresentam resistência à oxacilina (PFALLER et al., 1999; SADER et al., 1999).

Analisando o perfil de resistência das 61 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas neste estudo, constatamos resistência à oxacilina em 7 cepas (11,5%). Ao analisarmos estes pacientes, constatamos que todos haviam passado por internações uma ou mais vezes nos últimos 6 meses e alguns estavam fazendo uso de antimicrobianos no momento da coleta do exame.

O amplo uso de agentes antimicrobianos em hospitais e em locais fora dos hospitais como clínicas para doentes crônicos, creches e centros de engorda de animais, aumentam a pressão seletiva para o aparecimento de microrganismos resistentes naqueles ambientes. Estudos recentes têm demonstrado que os níveis de resistência de estafilococos, enterococos e pseudomonas são mais elevados em microrganismos oriundos de pacientes nas UTIs menores em pacientes provenientes de outras alas do hospital e menores ainda em pacientes ambulatoriais (ARCHIBALD et al., 1997).

A primeira cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi isolada em 1960, logo após a introdução da meticilina na terapêutica. Naquela data o número de isolados MRSA na comunidade era em torno de 0,1%, mas desde então tem se disseminado em todo o mundo. Estas cepas são mais freqüentemente isoladas em hospitais. Até o final da década de 70 havia pouca evidência da disseminação de cepas MRSA na comunidade. Entretanto, a partir da década de 80, vários relatos de infecção por MRSA em pacientes que não haviam sido internados nem tido contato com pessoal que trabalha em hospital foram publicados. Tem sido demonstrado que o estado de portador de MRSA persiste por anos em alguns pacientes, garantindo assim a disseminação dessas cepas, uma vez que estes pacientes voltam para a comunidade. Assim, parecem existir evidências de disseminação de MRSA na

comunidade e fora dos grupos de risco. Mais estudos são necessários para determinar o estado de disseminação dessas cepas na comunidade (KAUFFMAN et al., 1997).

Goldstein *et al.*, em trabalho publicado em 1996, constataram que 20% das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de úlceras de pé diabético, apresentavam resistência à oxacilina.

Neste estudo foram também isoladas cepas de *Streptococcus pyogenes* em 7,8% dos pacientes estudados. Este achado é bastante relevante, pois já são bem documentadas as seqüelas que podem advir de infecções crônicas causadas por estas bactérias. Hart *et al.*, (1998), em estudo sobre a resistência a antimicrobianos em países em desenvolvimento, relatam os altos percentuais de isolamentos resistentes a antimicrobianos nestes países e alertam para a ausência ou carência de laboratórios de microbiologia nesses países a fim de que o tratamento seja baseado no isolamento do agente e no traçado do seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Tratamentos empíricos dificultam a implantação de estratégias de tratamento, visto que a resistência varia de região para região, o que leva nesses países a um tratamento inadequado dos pacientes, com conseqüente aumento dos custos, morbidade e mortalidade.

Cepas de Enterococos resistentes a Vancomicina (VRE), são importantes patógenos humanos emergentes, estes são responsáveis por sérias infecções sistêmicas que envolvem o ambiente hospitalar (ELIOPOULOS, 1997). Estes patógenos atuam como colonizadores, participando da formação do biofilme que recobre o material hospitalar. Os VRE apresentam uma baixa prevalência de isolamento em hospitais da América Latina (COSTA et al, 1998; KERTÉSZ et al, 1998).

Estudos multicêntricos envolvendo 15 hospitais de 5 países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Equador e Venezuela), coletaram 24 cepas de VRE (21 *Enterococcus faecium* e 03 *Enterococcus faecalis*). Estudos mostraram que a espécie de *Enterococcus faecium* apresentou resistência a novas drogas como Streptogramina, Quipristina e Dalfospristina; drogas ainda pouco utilizadas em hospitais na América Latina (SADER et al, 1999).

Neste estudo, foram isolados 11 cepas de *Enterococcus* sp (3,7%), onde todas foram sensíveis à Vancomicina.

O grupo de bactérias anaeróbias estritas apresentou um percentual de isolamento de 17,0%, destacando o isolamento de *Bacteroides* do grupo *fragilis* e *Peptostreptococcus* sp.

Wheat *et al.*, (1986) obtiveram um percentual de isolamento de 15% enquanto, Louie *et al.*, em 1976 isolaram 44,8% de bactérias anaeróbias de 20 pacientes diabéticos com lesões de membros inferiores. Vale ressaltar que os pacientes estudados por Louie *et al.*, apresentavam comprometimento tecidual extenso.

Estudos realizados por Lawrence *et al.*, em 1994 envolvendo 66 pacientes diabéticos com úlceras mostraram que apenas 11% das espécies isoladas eram bactérias anaeróbias estritas e que a espécie mais freqüente foi o *Peptostreptococcus* sp.

Trabalhos realizados por Stuart *et al.*, em 1995 nos Estados Unidos com 52 pacientes diabéticos internados, isolaram 109 cepas de bactérias anaeróbias estritas com predominância da espécie de *Peptostreptococcus* sp. Devemos ressaltar que todos estes pacientes apresentavam infecções graves, onde 62% destes manifestavam um quadro de osteomielite comprovada. Neste estudo todas as úlceras classificadas como Grau V apresentavam organismos anaeróbios.

A resistência a antimicrobianos em bactérias anaeróbias estritas manteve-se relativamente estável até a década de 80. A partir de então vem se verificando crescente aumento de resistência. Entre os *Bacteroides* do grupo *fragilis* é que tem sido observado o maior número de cepas resistentes. Entretanto, estas bactérias ainda mantêm uma sensibilidade alta às Penicilinas, macrolídeos, cefalosporinas de última geração, carbapenens e cefalosporinas de segunda geração. Nesse trabalho, não foi possível realizar o antibiograma das bactérias anaeróbias estritas isoladas porque o número foi pequeno e muitas delas foram isoladas presuntivamente. Muitas vezes após a identificação presuntiva não conseguimos reisolares a cepa por estar associada a outras, facultativas ou anaeróbias estritas. Como estas bactérias são mais freqüentemente isoladas de infecções profundas, com presença de necrose, a predominância é de infecção polimicrobiana. E o sinergismo é uma condição já descrita e que ocorre comumente entre os anaeróbios (HECHT, 2000; FINEGOLD, 1992).

A escolha do antimicrobiano no tratamento de pacientes diabéticos com úlceras infectadas é empírico. Por este motivo, faz-se necessário que cada centro ou região tenham seus próprios dados sobre os microorganismos prevalentes nesses processos infecciosos para que uma terapia mais adequada possa ser aplicada. Relatos de crescente resistência bacteriana à antimicrobianos também tem contribuído para sedimentar a necessidade de que estudos de sensibilidade à antimicrobianos devam ser realizados com periodicidade, como recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS) (BAQUERO et al, 1992; BENNETT et al, 1993).

## 6 CONCLUSÃO

- A úlcera de Grau II foi prevalente (69,5%) nos 141 pacientes estudados.
- 83,7% dos pacientes apresentaram infecções associadas com enterobactérias e 69,5% apresentou infecção polimicrobiana..
- As enterobactérias isoladas mostraram alto percentual de resistência para Ampicilina, Tetraciclina, Cefalosporinas de primeira geração, Sulfametoxazol + Trimetoprim, Amoxicilina + Ác. clavulânico.
- 10 cepas de enterobactérias isoladas apresentaram características de produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), das quais 09 foram isoladas de pacientes que faziam uso de antimicrobianos.
- Dentre os cocos Gram positivos o *Staphylococcus aureus* foi a espécie mais frequentemente isolada neste estudo (43,3%).
- Foram isoladas 61 cepas de *Staphylococcus aureus* das quais 07 apresentaram resistência à Oxacilina (11,5%).
- A escolha do antimicrobiano no tratamento de pacientes diabéticos com úlceras infectadas é empírico. Por este motivo, faz-se necessário que cada centro ou região tenha seus próprios dados sobre os microorganismos prevalentes nesses processos infecciosos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Letter. *Nature*, v. 146, p. 837, 1940.

ABBOTT, C. A.; VIVEIKYTE, L.; WIV AMSON, S.; CARRINGTON, A. L.; BOULTON, A. J. .M. Multicenter study of the incidence of and pre-Dictive risk factors for diabetic neuropathic foot ulceration. *Diabetes Care*, v. 21, n. 7, p.1071-1075, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Foot care in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 20, suppl. 1, p. 531-532, 1997.

ARCHIBALD, P. L.; PHILLIPS, L.; MONNET, D.; MCGOWAN, J. E.; TENOVER, F.; GAYNES, R. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients. In the United States: in creasing importance of the intensive care unit. *Clin . Infect. Dis.*, v. 24, n. 2, p. 211-215, 1997.

BAILEY, T. S.; YU, H. M.; RAYFIELD, E. J. Patterns of foot examination in a diabetes clinic. *Am. J. Med.*, v. 78, n. 3, p. 371-374, 1985.

BAQUERO, F.; REIG, M. Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 11, p. 1016-1020, 1992.

BAUER et al *apud* TAVARES, 1996

BEATRIZ, H. J.; BORGES, M. F.; BRITO, N. V.; SANTOS, T. G. M.; THIRONE, P. A. C. Análise clínica e evolução de 70 casos de lesões podais infectadas em pacientes diabéticos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 43, n. 5, p. 366-372, 1999.

BENNETT, K. W.; ELEY, A. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *J. Med. Microbiol.*, v. 39, p. 246-254, 1993.



BOULTON, AJM.; KUBRUSLY, DB.; BOWKER, JH.; GADIA, MT.; QUINTERO, L.; BECKER, DM.; SKYLER, JS.; SOSENKO, JM. Impaired vibratory perception and diabetic foot ulceration. *Diabet. Med.*, v.3, p. 335-337, 1986

BOULTON, A. J. M. O pé diabético. *Clin. Med. Am. North*, v. 6, p. 1605-1625, 1988.

CAMPBELL, DR.; FREEDMAN, DV.; KOZAC, GD. **Diretrizes para o exame da perna e pé diabético e tratamento do pé diabético.** 2 ed. Belo Horizonte: Interlivros, 1995. Cap.2, p. 11-16

CAPUTO, G. M.; CAVANAGH, P. R.; ULBRECHT, J. S.; GIBBONS, G. W.; KARCHMER, A. W. Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *N. Engl. J. Med.*, v. 331, n. 13, p. 854-860, 1996.

CARS, O.; MÖLSTAD, S.; MELANDER A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet*, v. 357, p. 1851-1853, 2001.

CONSENSO INTERNACIONAL SOBRE PÉ DIABÉTICO. **Secretaria do estado.** Brasília – DF; 2001

COSTA, L. M. D; SOUZA, D. A.; MARTINS, L. T. F.; ZANELLA, R. C.; BRANDILEONE, M. C.; BOKERMAN, S.; SADER, H. S.; SOUZA, H. A. P. H. M. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 2, n. 3, p. 160-163, 1998.

CLEMENT, S. Complicações crônicas do diabetes mellitus. In: MC DUMONT, M. et al. **Segredos em endocrinologia.** São Paulo: Artes Médicas, 1997. p. 37-47.

CRAUSAZ, F.M.; CLAVEL, S.; LINIGER, C.; ALBEANU, A.; ASSAL, J. Additional factors associated with plantar ulcers in diabetic neuropathy. *Diabet. Med.*, v.5, p. 771-775, 1988.

DALE, N.; GERDIN, G. Foot infections in diabetic patients. The Role of Anaerobes Illinois, Chicago. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, suppl. 2, p. S283-S288, 1995.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOEM, G. V.; WINOKUR, P. L.; GALES, A. C.; SADER, H. S.; KUGLER, K.; BEACH, M. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial

susceptibility of isolates collected in the Unites States, Canada and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program,1997. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, n. 3, p. 595-607, 1999.

DINIZ, L. M. Diabetes do tipo 2: endemia em expansão. *Medicina. Jornal do Conselho Federal*, p. 13-14, julho/agosto 2000

DYKE, K.; GREGORY, P. Resistance to beta-lactams antibiotics. In: CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. **The staphylococci in human disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 113-140.

EHRlich et al *apud* TAVARES, 1996

ELIOPOULOS, G. M. Vancomycin-resistant enterococci. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 11, p. 851-865, 1997.

ENNE, V. I.; LIVERMORE, D. M.; STEPHESA, P.; HALL, L. M. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. **Lancet**, v. 357, p. 1325-1328, 2001.

FELDMEIER, H.; HEUKEIBACH, J.; GISELE, M.; SOUSA, A. Q.; BARBOSA, M. M.; CARVALHO, C. B. M. Bacterial superinfection in human tungiasis. **Trop. Med. Int. Health**, v. 7, n. 7, p. 559-569, 2002.

FINEGOLD, S. M.; BARON, E. J.; NEXLER, H. M. **A clinical guide to anaerobic infections**. Star Publ. Company, 1992.

FOSTER, A.; EDMONDS, M.E. Examination of the diabetic foot I. **Pract. Diabetes**, v.4, n.3, p. 105-106, 1987

GALES, A. C.; BOLMSTRÖM, A.; SAMPAIO, J.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial suceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) isolated in Brazilian hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 1, n. 4, p. 196-203, 1997.

GATES, R. H. Infecções em diabéticos. In: MC DUMONT, M. et al. **Segredos em endocrinologia**. São Paulo: Artes Médicas, 1997. p. 53-62.

GOLDSTEIN, E. J.; CITRON, D. M.; NESBIT, C. A. Diabetic foot infections: bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. **Diabetes Care**, v. 10, p. 638-641, 1996.

GRAYSON, M. L.; GIBBONS, G. W.; BALOGH, K.; LEVIN, E.; KARCHMER, A. W. Probing to bone in infected pedal ulcers: A clinical sign of underlying osteomyelitis in diabetic patients. **JAMA**, v. 273, n. 9, p. 721-723, 1995.

GUZMÁN-BLANCO, M.; CASELLA, J. M.; SADER, H. S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 14, p. 67-81, 2000.

HARRIS, M. I.; KLEIN, R.; WELBORN, T. A.; KNVIMAN, M. W. Onset of neuropathy occurs at least 4-7 years before clinical diagnosis. **Diabetes Care**, v. 15, p. 815-819, 1992.

HART, C. A.; KAMUKI, S. Antimicrobial resistance in developing countries. **BMJ**, v. 317, p. 647-650, 1998.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, 1997.

HERMELINDA, C. P. Pé diabético: aspectos fisiopatológicos, tratamento e prevenção. **Rev. Bras. Neurol. Psiquiatr.**, v. 1, p. 131-135, 1997.

HECHT DN. Resistance trends in anaerobic bacteria. *Clinical Microbiology Newsletter*, p.41-44, 2000

KAUFFMAN, C. A.; BRADLEY, S. F. Epidemiology of community-acquired infection. In: CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. (Ed.) **The staphylococci in human disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 309-330.

KIEHL et al *apud* TAVARES 1996

KERTESZ, D. A.; DI FABIO, J. L.; De CUNTO BRADILEONE, M. C.; CASTANEDA, E. Invasive *streptococcus pneumoniae* infection in Latin American Children: results of the Pan American Health Organization surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1355-1361, 1998.

KIRBY, W. M. M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. **Science**, v. 99, p. 452-453, 1944.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKEN, S. P. C.; WINN JR., W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia: Lippincott, 1997.

KOZAK, GP.; CAMPEBELL RD.; FRYKBERG RG.; HABERSHAW GM. Doença do pé diabético: um problema proeminente. Tratamento do pé diabético. Segunda edição, Rio de Janeiro. Interlivros, p. 1-10, 1996

LAWRENCE, A. L.; LAWRENCE, B.H. Bacterial pathogens in infected puncture wound in adults with diabetes. **J. Foot Ankle Surg.**, v. 33, n. 1, p. 91-97, 1994.

LEVIN, E. M. Diabetic foot lesions: pathogenesis and management. In: KERSTEEN, M. D.; WHITE, J. V. (Ed.). **Alternatives to open vascular surgery**. Philadelphia: Leppincott, 1995. chapt. 9, p. 94-122.

LIPSKY, B. A.; PECORARO, R. E.; WHEAT, V. J. The diabetic foot: soft tissue and bone infection. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 2, p. 409-432, 1990.

LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LEIBOVICI, L.; YEHEZKELLI, Y.; PORTER, A.; REGEV, A.; KAUZE, L.; HARELL, D. Influence of diabetes mellitus and glycemic control on the characteristics and out come of common infections. **Diabetic Med.**, v. 13, n. 5, p. 457-463, 1996.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

LOUIE, T. J.; BARTLETT, J. G.; TALLY, F. P.; GORBACH, S. L. Aerobic and anaerobic bacteria in diabetic foot ulcers. **Ann. Intern. Med.**, v. 85, p. 461-463, 1976.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian populacion agat 30-69 yr. The brazilian cooperative group on the study of diabetes prevalence. **Diabetes Care**, v. 15, p.1509-1516, 1992.

MEDEIROS et al *apud* TAVARES, 1996

MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinic microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. Washington, DC, 1999.

NATHAN, D. M.; MEIGS, J.; SINGER, D. E. The epidemiology of cardiovascular disease type 2 diabetes mellitus: how sweey it is or is it? **Lancet**, v. 350, suppl.1, p.4-9, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (NCCLS) **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standard**. 4<sup>th</sup> ed. 1997

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (NCCLS). **Performace standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard - M2A7**. 7<sup>th</sup> ed. 2000.

OHKUBO, Y.; HIDEKI, K.; ARAKI, E.; MIYATA, T.; ISAMI, S.; MOTOYOSHI, S.; KOJIMA, Y.; FURUYOSHI, N.; SCHICHIRI, M. Intensive insulin therapy prevents the progressive of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: A randomized prospective 6- year study. **Diabetes Res. Clin. Prat.**, v. 28, n. 2, p. 103-117, 1995.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000. p. 174.

PARISH, L. C. et al. *apud* KOZAK PG, 1996

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; KUGLER, K. C.; BEACH, M. L. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 33, n. 4, p. 283-297, 1999.

PIROTH, L.; AUBÉ, H.; DOILE, J. M.; MARTIN, M. V. Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of the therapeutic value? **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. 76-80, 1998.

ROUTH, H. B.; BHOWMIK, K. R.; PARISH, L. C.; BHOWMIK, N. K. Diabetic foot infection. **An. Bras. Dermatol.**, v. 71, n. 3, p. 243-249, 1996.

SANDERS, C. C.; BARRY, L. A.; WASHINGTON, J. A.; SHUBERT, C.; MOLAND, S. E.; TRACZEWSKI, M. M.; KNAPP, C.; MULDER, R. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with the vitek ESBL Test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 12, p. 2997-3001, 1996.

SADER, H. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C.; WINOKUR, P., KUGLER, K. C.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program (1997). SENTRY Latin American Study Group. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32, n. 4, p. 289-301, 1998.

SADER, H. S.; JONES, R. N.; BALLOW, C. H.; et al and the GSMART study Group: antimicrobial susceptibility of quinupristin/dalfopristin tested against gram-positive cocci from Latin America: Results from the global SMART (GSMART) surveillance study. In: **GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY**, 99, 1999, Chicago.

SADER, H. S. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 91-99, 2000.

SAPICO, F. L.; WITTE, J. L.; CANAWATI, H. N.; MONTGOMERIE, J. Z.; BESSMAN, A. N. The infected foot of the diabetic patient: quantitative microbiology and analysis of clinical features. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, p. S171-S176, 1984.

SEBALD, M.; PETIT, J. C. **Méthods de laboratoire: bactéries anaerobies et leur identificacion.**[ SL]: Institute Pauster, 1994.

SIROT, D. L.; GOLGSTEIN, F. W.; SOUSSY, C. J.; COURTIER, A. L.; HUSSON, M. O.; LEMOZY, J.; MEYRAN, M.; MOREL, C.; PEREZ, R.; QUENTIN-NOURY, C. Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of the family Enterobacteriaceae: a 3 years survey in France. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, n. 8, p. 1677-1681, 1992.

SKYLER, J. S. Prevention and treatment of diabetes and its complications. **Med. Clin. North Am.**, v. 82, 1998.

SPICHLER, E. R. S.; SPICHLER, D.; MARTINS, C. S. F.; L.J. Diabetic lower extremities amputation - Rio de Janeiro, BR. **Diabetologia**, v. 41, p. 90-96, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e classificação de DM e tratamento de DM tipo 2. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br>>. Acesso em: 22 ago. 2002.

SUMMANEN, N. P.; BARON, E. J.; CITRON, D. M. **Wadsworth anaerobic bacteriology manual**. 50. ed [s.l]: Star, 1993.

STUART, J.; LEBAHN, F.; PETERSON, L. R.; GERDING, D. N. Use of anaerobic collection and transport swab device to recover anaerobic bacteria from infected foot ulcers in diabetics. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 289-290, 1995.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 251-541.

TENOVER, F. C.; HUGHES, J. M. The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. **JAMA**, v. 275, n. 4, p. 300-304, 1996.

TENOVER, F. C.; MOHAMMED, M. J.; GORTON, T. S.; DEMBER, Z. F. Detecting and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in connecticut. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 4065-4070, 1999.

TENOVER, F. C. A melhor época, a pior época. A evolução do problema da resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos. **Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas. Relatório especial Hosp. Pract** p. 8-13, 2000.

WAGNER, F.W. Treatment of the diabetic foot. **Compr. Ther.**, v.10, n.4, p. 29-38,1984.

WEST, N. J. Systemic antimicrobial treatment of foot infections in diabetic patients. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 52, p. 1199-1207, 1995.

WHEAT, L. J.; ALLEN, S. D.; HENRY, M.; KERNEK, C. B.; SIDERS, J. A.; KUEBLER, T.; FINEBERG, N.; NORTON, J. Diabetic foot infections. Bacteriologic analysis. **Arch. Intern. Med.**, v. 146, n. 10, p. 1935-1940, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al *apud* TAVARES, 1996

YAN, J. J.; KO, W. C.; TSAI, S. H.; WU, H. M.; JIN YT, WU, J. J. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in Southern Taiwan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 12, p. 4320-4325, 2000.



## ANEXOS

## ANEXO I

### 1. MEIOS PARA TRANSPORTE

#### STUART

Composição:	
Tioglicolato	0,05g
Cloreto de cálcio	0,005g ou 1ml da sol.1
Glicerolfosfato de sódio	0,5g
Azul de metileno	1ml da sol.2
Ágar	0,15g
Água desmineralizada	50ml

- **Solução 1- Cloreto de cálcio**

Cloreto de cálcio	0,05g
Água deionizada	10ml

- **Solução 2- Azul de metileno (0,0001g/ml)**

Azul de metileno	0,01g
Água deionizada	100ml

Pesar os componentes descritos acima e adicionar 50 ml de água desmineralizada ou deionizada. Aquecer em manta aquecedora até a completa liquefação do ágar. Distribuir em aliquatas de 2,0ml em tubos de vidro com tampão de algodão de 13x100mm. Autoclavar à 121°C por 15 minutos. Depois de esfriar adicionar um swab grande previamente estéril no tubo.

### Cary & Blair modificado (PRAS)

Tioglicolato de sódio	0,3g
Fosfato dissódico dibásico	0,2g
Cloreto de sódio	1,0g
Cloreto de cálcio 1%	1,8ml
Solução de resazurina	0,8ml
Ágar	1,0ml
Água destilada	198ml

Preparo do meio:

Pesar os componentes acima e aquecer em banho maria até a dissolução do meio. Adicionar então, L-cisteína (0,1g)

PS: Caso a cisteína não dissolva em água, utiliza-se como slvente NaOH.

Ajustar o pH:8,4

Distribuir em alíquotas de 10ml em tubos de 16x160mm e com o meio ainda quente, antes de ir ao autoclave, adicionamos a este, mistura de gases.

Esterilizar em vapor fluente utilizando uma prensa.

## 2 MEIOS DE CULTURA PARA ANAERÓBIOS

### BRAIN HEART INFUSION (BHI)

BHI	37g
Extrato de levedura	5g
Água destilada	1000ml
Após fundir adicionar:	
Cisteína hidroclicídica	0,5g
Sol. resazurina	4ml
Sol. hemina/menadione	10ml

Esterilizar a 121°C, durante 15 minutos.

## ÁGAR SANGUE SUPLEMENTADO

BHI Ágar	47g
Extrato de levedura	5g
Água destilada	1000ml
Após fundir, adicionar:	
Sol. hemina/menadione	10ml
Cisteína	0,5g

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

## BBE (BACTEROIDES BILE ESCULINA) ÁGAR

Tripticase Soy Ágar (TSA)	40g
Oxgall	20g
Esculina	1,0g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Ágar	2,0g
Água destilada	1000ml
Após fundir, suplementar com:	
Hemina/menadione	1,0ml
Gentamicina (40mg/ml)	2,5ml

O pH deve ser ajustado para 7,0; distribuir em tubos de 16x160mm - 10ml por tubo.

## FENIL ETIL ÁLCOOL ÁGAR (PEA)

BHI Ágar	47g
Fenil etanol	2,5g
Água destilada	1000ml
Após fundir, adicionar:	
Hemina/menadione	10ml

### 3 PROVAS BIOQUÍMICAS

#### PROVA DA COAGULASE:

A coagulase é uma proteína de composição química desconhecida, com atividade semelhante à protombina, capaz de transformar o fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de um coágulo visível em um sistema analítico adequado. Acredita-se que a coagulase age *in vitro* produzindo uma barreira de fibrina no local da infecção estafilocócica. Isto pode servir para localizar os organismos em abscessos. No laboratório, a prova da coagulase é utilizada mais comumente para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) de outros estafilococos e micrococos.

A coagulase está presente em duas formas, livre e conjugada, e cada uma possui propriedades diferentes que requerem o uso de técnicas separadas:

Coagulase conjugada: (prova em lâmina); a coagulase conjugada, também conhecida como fator de aglutinação está presente nos filtrados de culturas. Os filamentos de fibrina são formados entre as células bacterianas suspensas em plasma(fibrinogênio) provocando sua aglutinação, indicada pela presença de agregados visíveis na lâmina. A atividade da coagulase conjugada não é inibida pelos anticorpos formados contra a coagulase livre.

Coagulase livre: (prova em tubo); a coagulase livre é uma substância semelhante à trombina, que se encontra nos filtrados de culturas. Quando uma suspensão de bactérias produtoras de coagulase é misturada em partes iguais com uma pequena quantidade de plasma em um tubo de ensaio, forma-se um coágulo visível como resultado da utilização dos fatores de coagulação do plasma, de maneira similar àquela da adição de trombina.

#### Prova em lâmina (coagulase conjugada)

- Coloca-se uma gota de água destilada ou solução fisiológica sobre uma lâmina de vidro.
- Emulsionar suavemente uma suspensão do organismo em estudo na gota de água utilizando uma alça de inoculação.
- Colocar uma gota do plasma reconstituído junto à gota da suspensão bacteriana. Misturar bem.
- Inclinar a lâmina para um e outro lado, observando a formação imediata de um precipitado granuloso ou de grumos brancos.

Prova em tubo:(coagulase livre)

- Colocar 0,5ml de plasma reconstituído no fundo de um tubo de ensaio.
- Adicionar 0,5 ml de uma cultura pura do organismo, misturar por rotação suave do tubo, evitando remover ou agitar o conteúdo. Colocar o tubo em um banho-maria de água a 37°C. Observar a formação de coágulo visível.

**PROVA DA CATALASE:**

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Quimicamente é uma hemoproteína, de estrutura semelhante à da hemoglobina, exceto que os quatro átomos de ferro da molécula estão em estado oxidado ( $Fe^{+3}$ ) em vez de reduzido ( $Fe^{+2}$ ). Excluindo os estreptococos, a maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias decompõe o peróxido através de peroxidases semelhantes à catalase, exceto que cada molécula contém somente um íon férrico.

Prova em lâmina:

- Com uma agulha de inoculação ou uma vareta, transferir células do centro de uma colônia bem isolada para a superfície de uma lâmina de vidro.
- Adicionar 1 ou 2 gotas de peróxido de hidrogênio a 3%. Recomenda-se que o organismo não seja adicionado ao reativo.

**CITOCROMO OXIDASE:**

A prova de citocromo oxidase utiliza certos reativos corantes, como o dicloridrato de p-fenilenodiamina, que atuam como aceptores artificiais de elétrons, substituindo o oxigênio. A p-fenilenodiamina é incolor no estado reduzido, mais na presença de citocromo oxidase e oxigênio atmosférico se oxida formando azul de indofenol.

A prova é geralmente realizada conforme um dos dois métodos: 1. Técnica direta em placas, na qual adicionam-se diretamente 2 a 3 gotas de reativo às colônias bacterianas isoladas que crescem em placas; e 2. Técnica indireta em tiras de papel, na qual adicionam-se algumas gotas do reativo em uma tira de papel de filtro utilizam-se tiras ou discos comerciais impregnadas com reativos secos. Recomenda-se o derivado Tetrametil de p-fenilenodiamina por ser mais estável em estocagem, mais sensível para a detecção de citocromo oxidase e

menos tóxico que o derivado dimetil. Em ambos os métodos, na zona reagente do papel, estende-se uma alça da colônia suspeita.

**RESULTADOS: POSITIVO:** Cor azul no local de inoculação

#### **PROVA DO INDOL:**

A prova do indol está baseada na formação de um complexo de cor vermelha quando o indol reage com o grupo aldeído p-dimetilaminobenzaldeído. Este é o princípio ativo dos reagentes de Kovac e Ehrlich. Deve-se utilizar um meio rico em triptofano. Na prática, empregam-se meios combinados tais como sulfeto-indol-motilidade (SIM). As provas rápidas, realizadas com tiras de papel filtro impregnadas com reativo de Kovac, são úteis na triagem de bactérias que são produtoras rápidas de indol.

**RESULTADO: POSITIVO** ( Formação de cor fucsina na superfície)

#### **VÖGES-PROSKAUER:**

O ácido pirúvico, composto principal formado pela degradação fermentativa da glicose, é metabolizado através de várias vias, de acordo com os sistemas enzimáticos que possuem as diferentes bactérias. Uma destas vias leva à produção de acetoína, um subproduto inativo. Na presença de oxigênio atmosférico e de hidróxido de potássio a 40%, a acetoína é convertida em diacetila e o  $\alpha$ -naftol atua como catalizador para revelar um complexo de cor vermelha.

**RESULTADO: POSITIVO** (Formação de cor vermelha)

#### **UTILIZAÇÃO DO CITRATO:**

A utilização do citrato por uma bactéria é detectada em meio de citrato, através da produção de subprodutos alcalinos. O meio contém citrato de sódio, um ânion, como única fonte de carbono e fosfato de amônia como única fonte de nitrogênio do sal de amônio, com a produção de amônia, levando a alcalinização do meio. O azul de bromotimol, amarelo em pH abaixo de 6,0 e azul em pH acima de 7,6 é o indicador.

**RESULTADO: POSITIVO** (Formação de cor azul no meio)

## UREASE:

A urease é uma enzima presente em muitas espécies de microorganismos que podem hidrolisar a uréia em amônia; esta reage em solução para formar carbonato de amônio, resultando na alcalinização e aumento do pH do meio.

## DESCARBOXILASES:

O caldo descarboxilase de Möeller é o meio base mais comumente usado para determinar a capacidade de descarboxilação das enterobactérias. Adiciona-se o aminoácido a ser avaliado ao meio antes da inoculação do organismo em estudo. Deve ser empregado paralelamente um controle que consiste de um tubo com meio base sem o aminoácido. Os dois tubos são incubados em condições anaeróbias, coloca-se uma camada de óleo mineral sobre o caldo. Durante os períodos iniciais da inoculação o meio de ambos os tubos tornam-se amarelos devido à fermentação da pequena quantidade de glicose. Se o aminoácido for descarboxilado, formam-se aminas alcalinas e o meio volta à cor púrpura original.

Lisina, ornitina e arginina são os três aminoácidos habitualmente avaliados na identificação das enterobactérias e produzem as seguintes aminas específicas:

LISINA.....	CADAVERINA
ORNITINA.....	PUTRECINA
ARGININA.....	CITRULINA

Na conversão de arginina em citrulina intervém uma desidrolse ao invés de uma descarboxilase, visto que na primeira etapa, o  $\text{NH}_2$  é retirado da arginina. Logo após, a citrulina é transformada em ornitina que, em seguida, sofre descarboxilação para formar putrescina.

## FENILALANINA DESAMINASE:

A prova de fenilalanina baseia-se na detecção de Ác. fenilpirúvico no meio, após o crescimento do organismo teste. A prova é positiva quando aparece uma cor verde, visível após a adição de uma solução de cloreto férrico a 10%.



## TSI (ÁGAR TRÍPLICE-AÇÚCAR FERRO):

O meio Ágar tríplice-açúcar ferro (TSI), é especialmente útil para a identificação de bactérias Gram Negativas isoladas em meios de isolamento primário. Este meio é composto por quatro compostos protéicos (extrato de carne, extrato de levedura, peptonas e protease peptonada) tornando nutricionalmente rico e a ausência de inibidores permite o crescimento de todas as espécies bacterianas, exceto as mais exigentes. A lactose está presente em uma concentração dez vezes maior que a glicose (a proporção de sacarose para glicose também é de 10:1). O sulfato ferroso, como detector de H<sub>2</sub>S, é um pouco menos sensível que outros sais férricos ou ferrosos. O indicador vermelho de fenol é amarelo em pH abaixo de 6,8. Visto que o pH do meio não inoculado está estabilizado em 7,4, a produção de quantidades relativamente pequenas de ácidos resultam em uma mudança visível de cor.

Os princípios bioquímicos nos quais baseiam-se as reações observadas no TSI são as seguintes (Quadro 1). Observa-se que o ágar encontra-se em uma posição inclinada; resultando essencialmente em duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo.

Quadro 1:

Ápice alcalino/Base alcalina	Ausência de fermentação de carboidrato
Ápice alcalino/Base ácida	Glicose fermentada; lactose e sacarose não fermentadas
Ápice alcalino/Base ácida (negra)	Glicose frementada; lactose não fermentada, H <sub>2</sub> S produzido. Característica de bactérias não fermentadoras de lactose.
Ápice ácido/Base ácida	Glicose , lactose e sacarose fermentadas

## SIM:

O meio SIM tem encontrado amplo uso em laboratórios de microbiologia clínica, porque podem avaliar mais de uma característica em um mesmo tubo; tais como: Motilidade, Indol e produção de sulfeto.

A prova de motilidade é interpretada realizando-se um exame macroscópico do meio para se observar uma zona de crescimento difuso, que parte da linha de inoculação. Os sais de tetrazólio são incolores, sendo transformados em complexos insolúveis pelas propriedades

reduzidas das bactérias em crescimento. Inocular o microorganismo ao meio, após esta etapa incubá-lo a 36°C durante 18 a 24hs. Ao término deste período, examinar a motilidade, a produção de sulfeto e adicionar 2 a 5 gotas de reativo de Kovacs ao meio.

#### **PROVA DO CALDO HIPERCLORADO (NaCl 6,5%):**

Os estreptococos do grupo D não- enterococos se diferenciam dos enterococos pela ausência de crescimento em NaCl a 6,5%.

#### **IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE ESTREPTOCOCOS:**

Os estreptococos são classificados sorologicamente nos grupos de Lancefield A, B, C, D, etc.; com base nas características antigênicas dos carboidratos C grupo-específicos de suas paredes celulares.

#### **PRINCÍPIO:**

A determinação do grupo sorológico dos estreptococos é efetuada através das provas de precipitação. Devem-se extrair primeiramente os determinantes antigênicos das células estreptocócicas e em seguida fazê-los reagir com anti-soros absorvidos, de especificidade conhecida. A extração pode ser realizada utilizando-se ácido a quente (Lancefield), formamida a quente (Fuller), autoclavação, Ác. nitroso, etc. A prova de precipitação é realizada mais comumente com tubos capilares, nos quais se forma uma camada de anti-soro sobre o extrato antigênico ou vice-versa.

#### **INTERPRETAÇÃO:**

Após 5 a 10 minutos, examinar o tubo capilar com luz brilhante contra fundo escuro. Uma névoa branca ou anel no centro da coluna representa uma prova positiva. Uma reação forte aparece em 5 minutos; uma reação mais fraca se desenvolve mais lentamente. Visto que após 30 minutos a reação pode esmaecer ou aparecer como falsa positiva, deve-se examinar o tubo em intervalos entre 10 a 30 minutos.

#### 4 AGENTES ANTIMICROBIANOS TESTADOS:

##### GÊNEROS BACTERIANOS:

- *Staphylococcus aureus:*

Amoxicilina + ác. clavulânico, cefalotina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, rifampicina, sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina, vancomicina.

- *Enterococcus sp:*

Amicacina, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, imipenem, penicilina, tetraciclina, vancomicina.

- *Pseudomonas aeruginosas:*

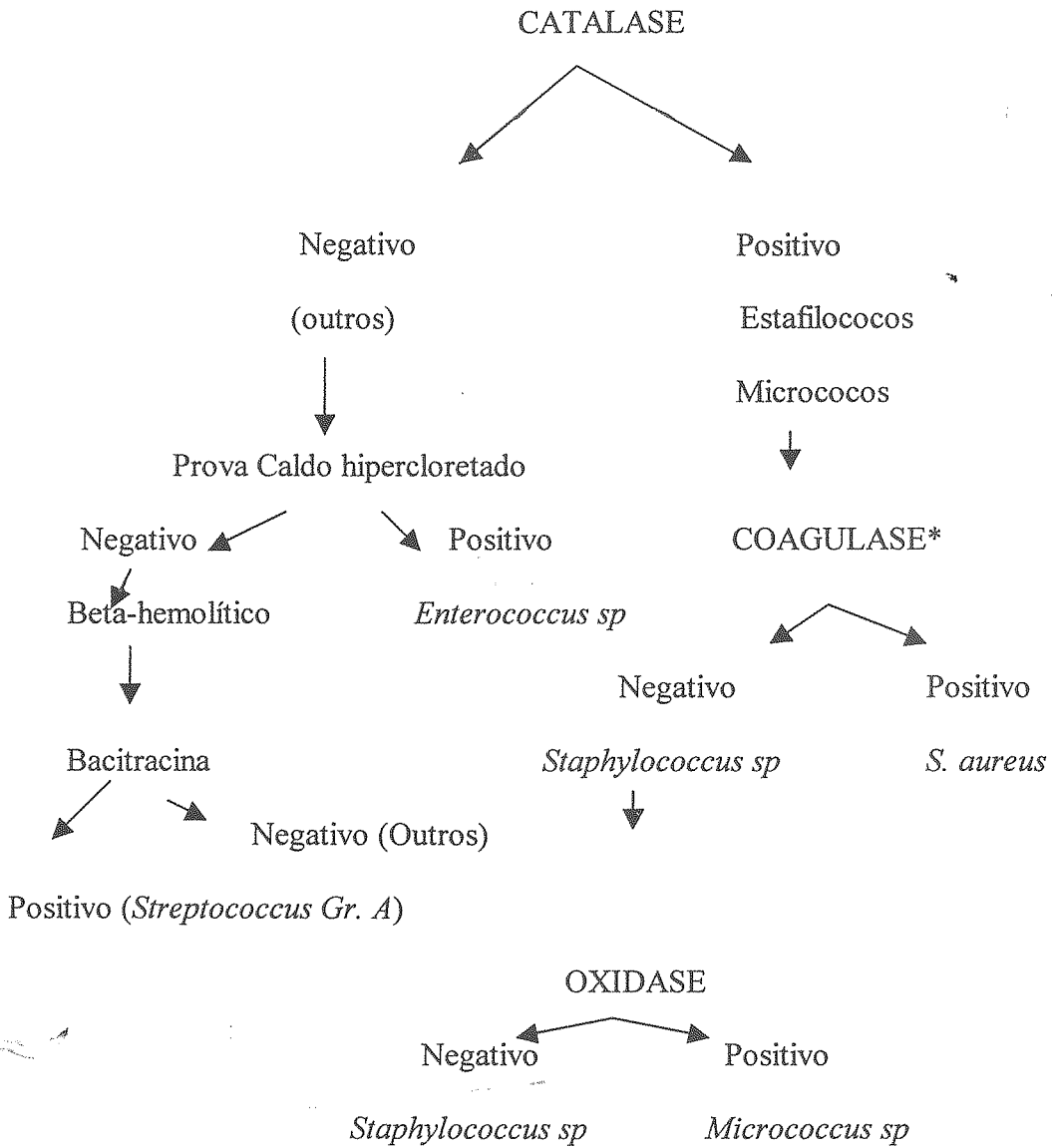
Amicacina, aztreonam, cefepime, cefoperazona, ceftazidima, ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, ofloxacina, sulfametoxazol + trimetoprim, tobramicina.

- *Enterobacteriaceae:*

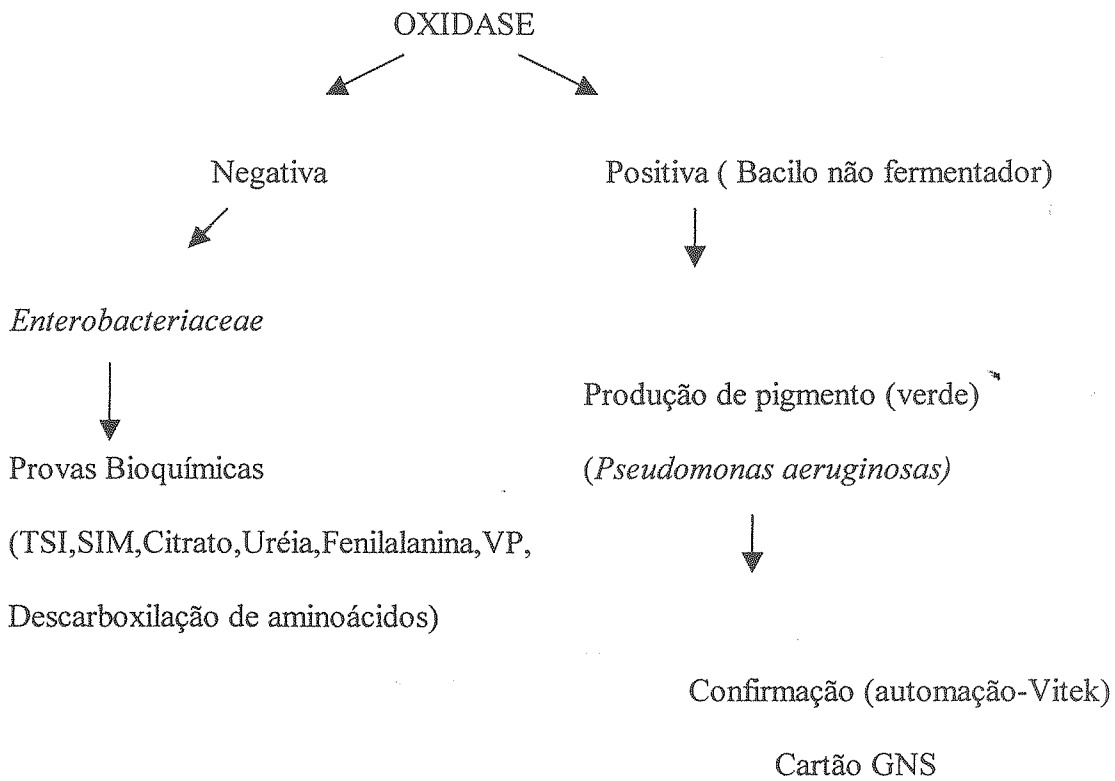
Amoxicilina + ác. clavulânico, ampicilina, amicacina, aztreonam, cefalotina, cefotaxima, cefoxitina, cefepime, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, netilmicina, sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina.

# FLUXOGRAMAS

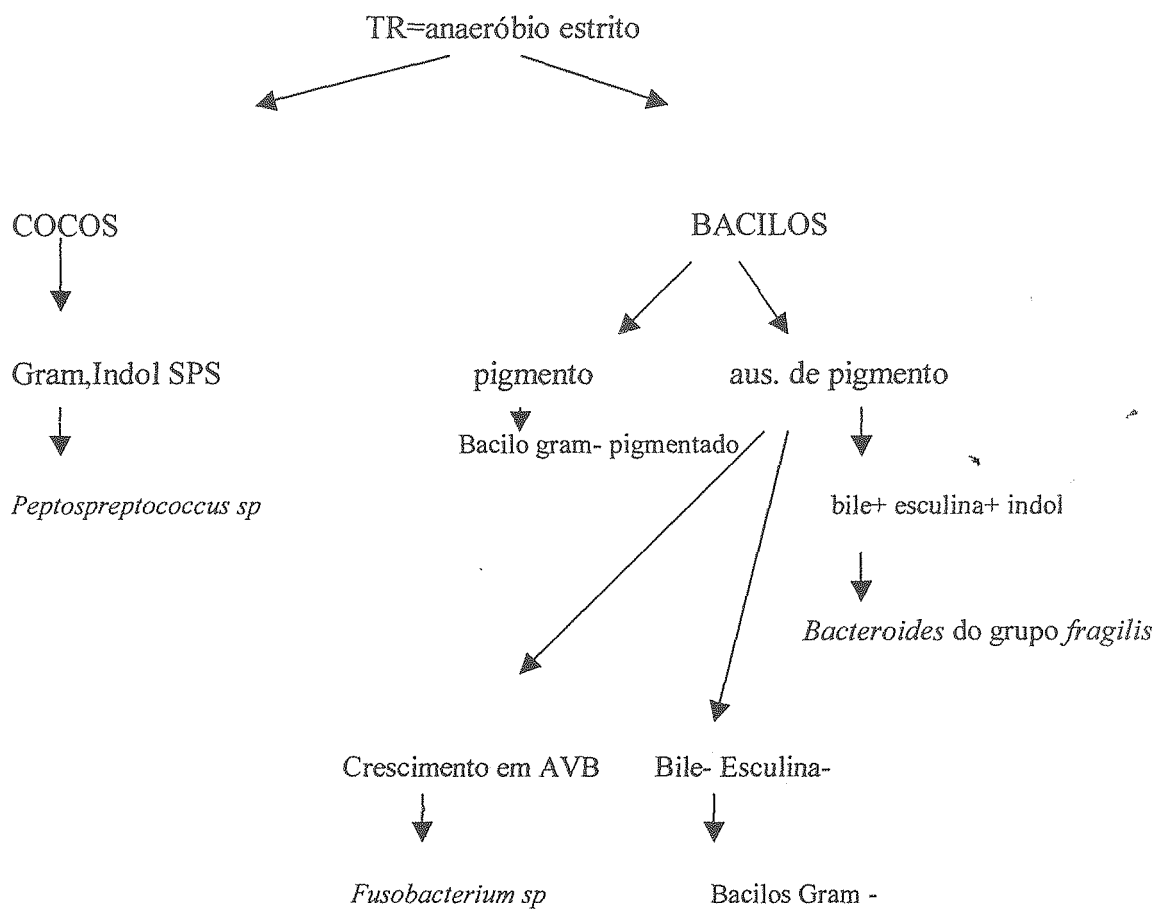
- IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM POSITIVOS:



• IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS:

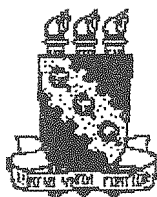


• IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS



## ANEXO II

1. Termo de aprovação do estudo frente ao comitê de ética -UFC
2. Ficha utilizada na pesquisa
3. Ficha de pronto atendimento
4. Consentimento do CIDH-Ce para a realização da pesquisa
5. Resumo de trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia de 2001
6. Resumo de trabalho apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Diabetes de 2001
7. Carta de aceite de publicação do trabalho: *ENTEROBACTERIACEAE* AND ESBL-PRODUCING STRAINS ISOLATED FROM INFECTED DIABETIC FEET IN BRAZILIAN DIABETIC CENTER
8. Trabalho submetido a aprovação pela *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*
9. Declaração de correção da dissertação.



Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 10/00

Fortaleza, 28 de janeiro de 2000

Protocolo n° 05/00

Dept°./Serviço: Departamento de Patologia e Medicina Legal

Título do Projeto: "Pé diabético" perfil de isolamento e de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em 2 Centros hospitalares de Fortaleza<sup>2</sup>

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 27 de janeiro de 2000.

Atenciosamente,

**Dra. Mirian Parente Monteiro**  
Coordenadora Adjunta do Comitê de Ética em Pesquisa  
COMEPE/HUWC/UFC



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

PESQUISA PÉ DIABÉTICO

AUTORIZAÇÃO DO PACIENTE PARA COLETA DO ESPÉCIME:-----

NOME:----- PRONTUÁRIO:-----

LOCALIDADE:----- DATA DA COLETA:-----

DATA DO NASCIMENTO:----/----/---- PROFISSÃO: (01) APOSENTADO(A); (02) COMERCIANTE  
(03) DOMÉSTICA; (04) OUTROS

TEMPO DE DIABETES: (01) 01-10 ANOS (02) 11-20 ANOS (03) 21-30 ANOS (04) < 30 ANOS

TAXA GLICÊMICA: (03 MESES) -----;-----;-----

• ESTUDO DA LESÃO:

ORIGEM: (01) TRAUMA; (02) CALO; (03) NÃO SABE INFORMAR; (04) OUTRAS CAUSAS

GRAU DE WAGNER: (0) (I) (II) (IV) (V)

USO DE ANTIMICROBIANOS ANTES DA COLETA: (01) NÃO (02) SIM

• ESTUDO BACTERIOLÓGICO:

TIPO DE INFECÇÃO: (01) MONOMICROBIANA (02) POLIMICROBIANA

AGENTE I:.....

PERFIL ANTIMICROBIANO: DROGAS SENSÍVEIS:.....  
DROGAS RESISTENTES:.....

AGENTE II:.....

PERFIL ANTIMICROBIANO: DROGAS SENSÍVEIS:.....  
DROGAS RESISTENTES:.....

AGENTE III:.....

PERFIL ANTIMICROBIANO: DROGAS SENSÍVEIS:.....  
DROGAS RESISTENTES:.....

AGENTE IV:.....


PERFIL ANTIMICROBIANO: DROGAS SENSÍVEIS:.....  
DROGAS RESISTENTES:.....




## DECLARAÇÃO

Declaramos para dos devidos fins que é de grande importância para os pacientes e de interesse do Ambulatório do Pé Diabético do Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão/CIDH, a realização de exame microbiológico (cultura e antibiograma) de material colhido de feridas infectadas destes pacientes. Para tanto, autorizamos aos participantes deste Projeto de Pesquisa a coleta do material quando da realização do exame e limpeza destas feridas, sem causar nenhum desconforto ou prejuízo ao paciente.

Fortaleza, 21 de agosto de 2000.

  
Margarida Mota de Oliveira  
Enfermeira

  
Viviana Menezes Costa  
Administradora do CIDH

## PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE PÉ DIABÉTICO EM PACIENTES AMBULATORIAIS

Motta, RN<sup>1</sup>; Oliveira, MM<sup>2</sup>; Dias, AM<sup>1</sup>; Magalhães, PSF<sup>1</sup>; Nogueira, MB<sup>1</sup>; Carvalho, CBM<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce

<sup>2</sup>Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão(CIDH),Fortaleza-Ce

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla e um dos mais importantes problemas de saúde da atualidade. Estima-se que no Brasil existam 5 milhões de diabéticos com uma prevalência de 7,6%. A infecção dos pés é uma das complicações mais comuns, acometendo 25% dos diabéticos. É uma infecção polimicrobiana tendo as enterobactérias como um grupo com relevante participação nesse processo infeccioso, sendo as espécies *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* as mais freqüentemente isoladas. Com o objetivo de determinar o perfil de resistência das cepas de enterobactérias isoladas de pacientes com pé diabético e infecção comunitária está sendo realizado este trabalho. Entre março de 2000 a junho de 2001, foram analisados 89 espécimes clínicos isolados de pacientes atendidos no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão (CIDH) em Fortaleza. As amostras foram coletadas com swabs após antissepsia externa e acondicionadas em meio para transporte (Stuart) até o processamento das mesmas. Os swabs foram semeados em ágar- sangue (incubação 35 graus-24/48h) Mac Conkey e BHI. As cepas foram caracterizadas através de provas bioquímicas convencionais, e pelo método de Gram. As cepas identificadas foram testadas frente à susceptibilidade segundo a metodologia padrão de antibiograma convencional (Kirby-Bauer). Foi verificado uma alta sensibilidade aos aminoglicosídeos e quinolonas. Um achado não esperado foi o de 07 cepas com padrão fenotípico de ESBL. Tratando-se de pacientes ambulatoriais este resultado deverá ser melhor investigado.

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES DE PÉ  
DIABÉTICO EM PACIENTES ATENDIDOS NO CIDH/CE**

Oliveira MM<sup>1</sup> ; Motta RN<sup>2</sup> ; Forte AC<sup>1</sup> ; Magalhães PSF<sup>2</sup>; Dias AM<sup>2</sup>;  
Carvalho CBM<sup>2</sup>.

Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão (CIDH)<sup>1</sup>

Universidade Federal do Ceará (UFC)<sup>2</sup>

Estima-se que no Brasil existam 5 milhões de diabéticos com uma prevalência de 7,6% e de 6,5% em Fortaleza. A infecção dos pés é uma das complicações mais comuns. É polimicrobiana e acomete 25% dos diabéticos. Até a presente data, não é conhecido o perfil epidemiológico das infecções de pé diabético em nosso meio. Dessa forma está sendo realizada esta pesquisa com objetivo de identificar as bactérias mais freqüentemente envolvidas na infecção do pé diabético e traçar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos destas. Para isso, os espécimes clínicos colhidos de pacientes atendidos no CIDH passam por todas as etapas do exame microbiológico seguindo metodologia descrita nos manuais de microbiologia e artigos atuais. Até junho de 2001 foram isolados 187 cepas bacterianas de 89 pacientes. Do total 23 cepas foram classificadas como anaeróbias estritas e 164 como anaeróbias facultativas e aeróbias estritas. Entre as bactérias anaeróbias facultativas foram isoladas 87 enterobactérias, 44 *Staphylococcus Aureus* e 07 cepas de *Streptococcus Pyogens*. Com relação a resistência a antimicrobianos, 05 cepas de *Staphylococcus Aureus* foram resistente a oxacilina. Entre as enterobactérias foi observado que cerca de 90% das cepas eram sensíveis aos aminoglicosídeos e mais de 50% resistentes a ampicilina, sulfametoxazol + trimetoprima e cefalosporinas de primeira geração.



September 12, 2002

Dear Dr. Cibele B M Carvalho,

Based on the careful review of your manuscript entitled, "*ENTEROBACTERIACE AND ESBL-PRODUCING STRAINS ISOLATED FROM INFECTED DIABETIC FEET IN A BRAZILIAN DIABETIC CENTER?*" the Editorial Board of the BJID is pleased to accept it for publication in the BJID. As soon as possible you will receive the galley proof for your conference and in which number of BJID the article will be published.

Sincerely yours,

  
Heloisa Carvalho  
Submissions Manager

**ENTEROBACTERIACEAE AND ESBL-PRODUCING STRAINS  
ISOLATED FROM INFECTED DIABETIC FEET IN A BRAZILIAN  
DIABETIC CENTER**

Motta R N<sup>2</sup>, Oliveira M M<sup>1</sup>, Magalhães P S F<sup>2</sup>, Dias A M<sup>2</sup>, Aragão LP<sup>2</sup>, Forti  
A C<sup>1</sup>, Carvalho C B M\*<sup>2</sup>

Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão (CIDH)<sup>1</sup> Rua Silva Paulet 2406, 60120 021

Fortaleza-Ce

Universidade Federal do Ceará (UFC)<sup>2</sup>

\*Corresponding author: Cibele B.M. Carvalho. Mailing address: Departamento de  
Patologia e Medicina Legal (UFC) Rua Monsenhor Furtado s/n. Cx Postal 3163. 60441-  
750. Fortaleza-Ce/Br

Fax: (85) 288 8316. E-mail: cbmc@secrel.com.br

## ABSTRACT

In a prospective study, we have bacteriologically analyzed 156 species of Enterobacteriaceae isolated from 138 patients with community-acquired diabetic foot ulcers. The study was undertaken at a Diabetic Center and at the Federal University of Ceará, Brazil, from March 2000 to November 2001. The samples were cultured using selective media and the identification, susceptibility tests and detection of ESBL producing strains were done by conventional and automated methods. The most frequently occurring pathogens were *K. pneumoniae* (21.2%), *Morganella morganii* (19.9%) and *E. coli* (15.4%). High resistance rates were noted for ampicillin, first generation cephalosporin, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, amoxicillin-clavulanic acid and chloramphenicol. ESBL producing strains were detected in 6% of the patients studied. Resistance among gram-negative bacteria has become increasingly common, even in community-acquired infections.

Key words: ESBL-producing strains, antimicrobial resistance, *Enterobacteriaceae*

## INTRODUCTION

Nowadays diabetes mellitus is one of the world's most important health problems. In Brazil, there are estimated to be approximately 5 million diabetics of which half are unaware that they have the disease. The prevalence of diabetics between 30 and 69 years old is 7.6%. Diabetic patients with foot ulcers present the majority of patients who attend Brazilian university hospitals. The prevalence is 6.4% in the state of Ceará, Brazil, with the rate of unknown disease of 64% [1,2].

It has been estimated that an ulcer develops on the foot or ankle in 15% of diabetic patients at some time. Infection is a common sequela of diabetic foot ulceration and trauma, which, once established, becomes progressively severe and more difficult to treat. The infections are polymicrobial in origin. Representative organisms include aerobic gram-positive cocci, gram-negative bacilli (*Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Proteus* species) and anaerobes (*Bacteroides* species and *Peptostreptococcus*). [3].

Enterobacteria are an important pathogenic group in community and hospital-acquired infections and resistance among them has become increasingly common. The most serious resistance patterns now emerging among Gram-negative organisms include resistance to extended-spectrum cephalosporins and penicillins [4].

In Latin America, resistant bacteria are emerging as a real threat to the favorable outcome of common infections in community and hospital settings. The time to change long-accepted prescription practices is coming, and every effort should be made to provide the prescribers the pertinent information related to changing patterns of resistance [5].



In fact, local epidemiological studies of bacterial resistance are necessary mainly in developing countries where the auto medication culture (antimicrobial agents) is largely disseminated. Considering the great importance of enterobacteria and the participation in diabetic foot ulcer infections, the present study has as its purposes:

a) to analyze, in a prospective study, the prevalence of enterobacteria and ESBL-producing strains isolated from diabetic patients with community-acquired foot infection.

b) to monitor the patterns of susceptibilities of the species isolated.

## MATERIAL AND METHODS

### PATIENT SELECTION

The subjects of this study consisted of - one hundred and forty one patients with diabetes who had an infected foot ulcer and who attended the CIDH (Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão) located in Fortaleza, Ceará, Brazil, between March 1, 2000 and November 30, 2001. The data were collected prospectively. Each patient was included only once in the study. They were taken to a specialized ambulatory in foot ulcer after they had been registered at the health station and after they had their diabetic diagnosis established.

### BACTERIOLOGIC PROCEDURES

All patients had signs of mild to moderate localized infection (cellulites, exudates, etc). The surface of the wound was prepared with a vigorous saline scrub followed by debridement of superficial exudates using sterile instruments. Specimens were obtained by scraping the ulcer base or the deep portion of the wound edge with a sterile swab. The

specimens were collected with a swab and transported in a Stuart transport medium [6,7]. Bacteriological studies were performed in the microbiology laboratory of the Federal University of Ceará . Total transfer time to the laboratory was no longer than two hours. For aerobic and facultative strains the specimens were inoculated into blood agar (BAP), MacConkey agar and Brain Heart Infusion broth (BHI). The media were incubated at 35°C and conventional temperature. Bacteria were identified by conventional biochemical tests [8] and/or by an automated system VITEK (bioMérieux Vitek, St. Louis).

#### SUSCEPTIBILITY TESTING

Antimicrobial susceptibility testing of isolates was done by the reference agar diffusion method as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [9] and by the VITEK system. Quality control was done by the *Escherichia coli* ATCC test (American Type Culture Collection) 25922. The antimicrobials agents tested were: ampicillin, amikacin, gentamicin, amoxicillin-clavulanic acid, aztreonam, cephalotin, ceftioxin, cefotaxime, ceftriaxone, ciprofloxacin, cefepime, chloramphenicol, imipenem, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline.

#### ESBL-PRODUCING STRAINS

Those strains that showed the phenotypic standard compatible with ESBL-producing strains in the agar diffusion method and identified as ESBL-producing strains by the VITEK system, were later confirmed in accordance with the NCCLS recommendation (Double disk diffusion technique).

## RESULTS

### a) Information on clinical isolates

The most frequent bacterial group isolated was Enterobacteria (97,8%) with 156 species from 138 patients. The 5 most frequently occurring pathogens were (n° / %): *Klebsiella pneumoniae* (33/21.2%), *Morganella morganii* (31/19.9%), *Escherichia coli* (24/15.4%), *Proteus mirabilis* (23/14.7%) and *Enterobacter aerogenes* (10/6.4%). The top six pathogens accounted for 77.6% of all isolates.

### b) Susceptibilities

Resistance rates of the Enterobacteriaceae strains are demonstrated in Figure 1 and 2. The resistance rates to ampicillin, tetracycline, cefalotin and sulfonamides were 68.6%, 64.1%, 51.3% and 37.2%, respectively. The greatest spectrum of enterobacteria activity was shown by the carbapenems (100% susceptibility for imipenem) followed by ciprofloxacin and the fourth generation cephalosporin cefepime and gentamicin.

### c) ESBL-producing strains

ESBL-producing strains were isolated from 10 patients. The isolated species were *K. pneumoniae* (7 strains) and *E. coli* (3 strains). Four of the patients had been interned during the preceding 30 days. One patient showed a recent lesion with 10 days evolution without using antimicrobial agents. The remaining five patients had taken an antimicrobial agent during the preceding 30 days (cefalexin and ampicillin). None of the aminoglycosides showed good activity against the 10 strains tested. The activity of the  $\beta$ -lactamase inhibitor association compounds, quinolones, aztreonam, and other class of antibiotics such as

chloramphenicol trimethoprim/sulfamethoxazole were not satisfactory. Only imipenem showed good activity, and inhibited 100% of the isolates.

## DISCUSSION

Enterobacteria are a common isolate in diabetic infected ulcers. In a study conducted in the seventies, Louie *et al* [10], isolated enterobacteria in 11 patients among a group of 20 patients with foot ulcer. Goldstein *et al* (1996) [11] in a prospective study to determine the relative frequency of bacterial isolates cultured from community-acquired foot infections, isolated enterobacteria in 48% of the 25 patients studied. When analyzed by prior exposure to antibiotics, patients who had previously received antibiotics were more likely to have MRSA, enterococci and *P. aeruginosa*. In the present study, enterobacteria were the most frequently isolated species (in 97.8% of the patients). Cefalexin was the antimicrobial agent consumed by 56% of those patients.

There is a clear association between heavy antimicrobial consumption within a population and the frequent recovery of resistant bacteria [12]. Cars *et al* [13], compared the non-hospital use of antibiotics in the 15 member states of European Union in 1997 and verified that in 11 of the 15 countries, the most commonly used antibiotic was broad-spectrum penicillin. Data on antibiotic sales are not publicly available in many countries including Brazil.. Enterobacteria isolated in this study showed a high percentage of resistance to ampicillin, tetracycline, the first generation cephalosporin, trimethoprim/sulfamethoxazole, amoxicillin + clavulanic acid and chloramphenicol. It is unclear why Gram-negative isolates from Latin America should manifest such high rates of

resistance. Reasons may include: differences in antimicrobial use, infection control practices, climate and other unrecognized factors [14].

Enterobacteria are an important group in community and hospital-acquired infections. They are common precipitants of sepsis by virtue of the inflammatory response activated by endotoxin present in the Gram-negative cell wall. Patients with diabetes mellitus and patients needing dialysis are a high-risk group to the enterobacteria infection. Unfortunately, resistance among gram-negative bacteria has become increasingly common, making empirical therapy decisions more difficult. The most serious resistance patterns now emerging among Gram-negative organisms include resistance to extended-spectrum cephalosporins and penicillins[4]. These resistances are commonly mediated by extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species or by the hyper production of chromosomally mediated cephalosporinases (Bush group 1 amp C enzymes) in *Citrobacter*, *Serratia* and *Citrobacter species* [13]. The extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes result generally from point mutations in the genes of broad-spectrum  $\beta$ -lactamase Ambler class A enzymes, such as TEM-1, TEM-2 or SHV-1. They are usually located in conjugative megaplasmids, which often carry the genes responsible for resistance to other antibacterial drugs, causing serious difficulties for the treatment of infections caused by bacterial isolates producing those enzymes [15].

Along with ESBLs, the emergence of plasmid-mediated Ambler class C cephalosporinases (or Bush group 1 cephalosporinases) has occurred among clinical isolates of the *Enterobacteriaceae*. These enzymes can produce resistance to cephamycins, extended spectrum cephalosporins and aztreonam, and unlike class A ESBLs,  $\beta$ -lactamase inhibitors do not inhibit them. [16].

✓ The emergence of plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) among members of the family Enterobacteriaceae has become a growing worldwide problem [17, 18,19].

In France, 14.1% of K. pneumoniae isolated from 12 university hospitals were cefotaxime resistant until 1990, and, in a training hospital, 51% of K. pneumoniae were ESBL-producing strains (19). In the United States, National Nosocomial Infection Surveillance notifications indicated 5 % of general resistance to ceftazidime until 1991. Although those strains were found initially on the West and East Coasts and in the Chicago region, K. pneumoniae ESBL producing strains are now widely spread all over the United States (20,21). A total of 1210 clinical isolates of Escherichia coli, collected from a University hospital in Southern Taiwan in 1999, were screened for ESBL-producing strains and the rate of prevalence in that study was 1.6%, lower than that reported in Japan (2.9 to 8.%) [17]

Until 1987, there were no reports of ESBLs from the southern cone of South America (5). In 1997 the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program analyzed ESBL producing strains (E. coli and K. pneumoniae), isolated from the bloodstream, and found that ESBL producing strains causing blood infections varied from 4.5% (Uruguay) to 12% (Chile and Mexico) among E. coli, and from 31% (Mexico) to 56.6% (Brazil) among K. pneumoniae [4].

In 1998 a Brazilian multicenter study was conducted by the Sentry Antimicrobial Surveillance Program, from 20 clinical laboratories and 36 hospitals located in different regions of Brazil. 855 isolates were evaluated including 591 enterobacteria. The two most frequently occurring pathogens were E. coli and K. pneumoniae. Among the Brazilian ✓

isolates collected by the SENTRY program, 13.6% of *E. coli* and 42.1% of *K. pneumoniae* were ESBL producing strains [22,23]. In this study, the isolation rate of ESBL-producing strains was 6%, possibly reflecting the community spread of those strains. The resistance profile found was similar to the studies described in the surveillance SENTRY program and indicates a combination of other beta-lactamases or hyper production of ESBL, or even the ESBL presence from 2br group, according Bush et al. classification [16].

## CONCLUSION

Unfortunately, resistance among gram-negative bacteria has become increasingly common, making empirical therapy decisions more difficult. Sometimes empiric therapy is necessary, mainly in therapeutic-centers working without microbiology laboratories and with very limited patient conditions. Government help is therefore needed to obtain any available medication. Improvements need to be made to microbiological laboratories in hospitals and medical centers. There is also a need for periodic antibiotic resistance controlling to give guidance to physicians and the local population on the use of antibiotics. Without firmly established diagnosis and antibiotic use strategies, we are, overtreating with the inevitable consequences.

## Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Dr. Carlos Alberto Cunha Nascimento, Graziela Nogueira da Silva e Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues for technical help.

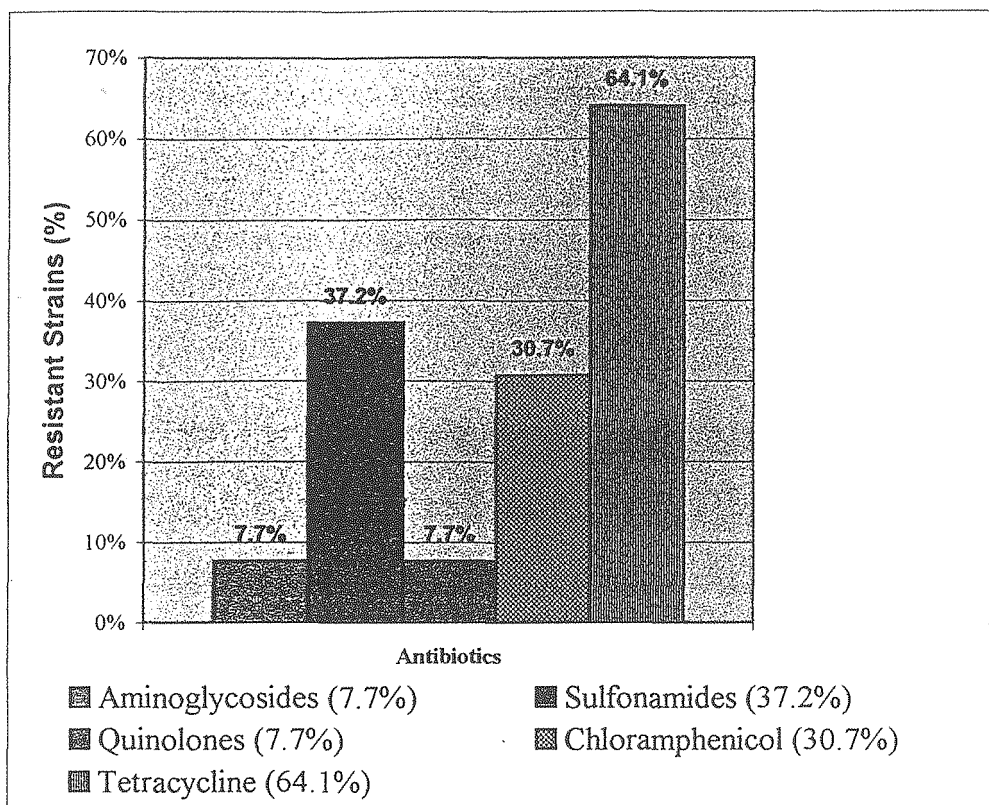
## REFERENCES

1. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diagnóstico e Classificação de DM e tratamento de DM tipo 2. Available from: <http://www.diabetes.org.br>
2. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Available from: <http://www.funasa.gov.br>
3. Slovenkaí MP. Foot problems in diabetes. Medical Clinics of North America 1998; 82: 9948-970.
4. 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 and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. Clin Infect Dis 1999; 29:595-607.
5. Guzmán-Blanco M, Casellas JM, Sader HS. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. Infect Dis Clin North Am 2000; 14: 67-81
6. Sapico SL, Witte JL, Canawati HN, Montgomerie JZ, Bessman AN. The infected foot of the diabetic patient: quantitative microbiology and analysis of clinical features. Reviews of Infectious Diseases 1994; 6 : 171-6.
7. Johnson S, Lebahn F, Peterson LR, Gerding DN. Use of anaerobic collection and transport swab device to recover anaerobic bacteria from infected foot ulcers in diabetics. Clin Infect Dis 1995; 20:289-90.
8. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Washington DC: ASM Press, 1999.

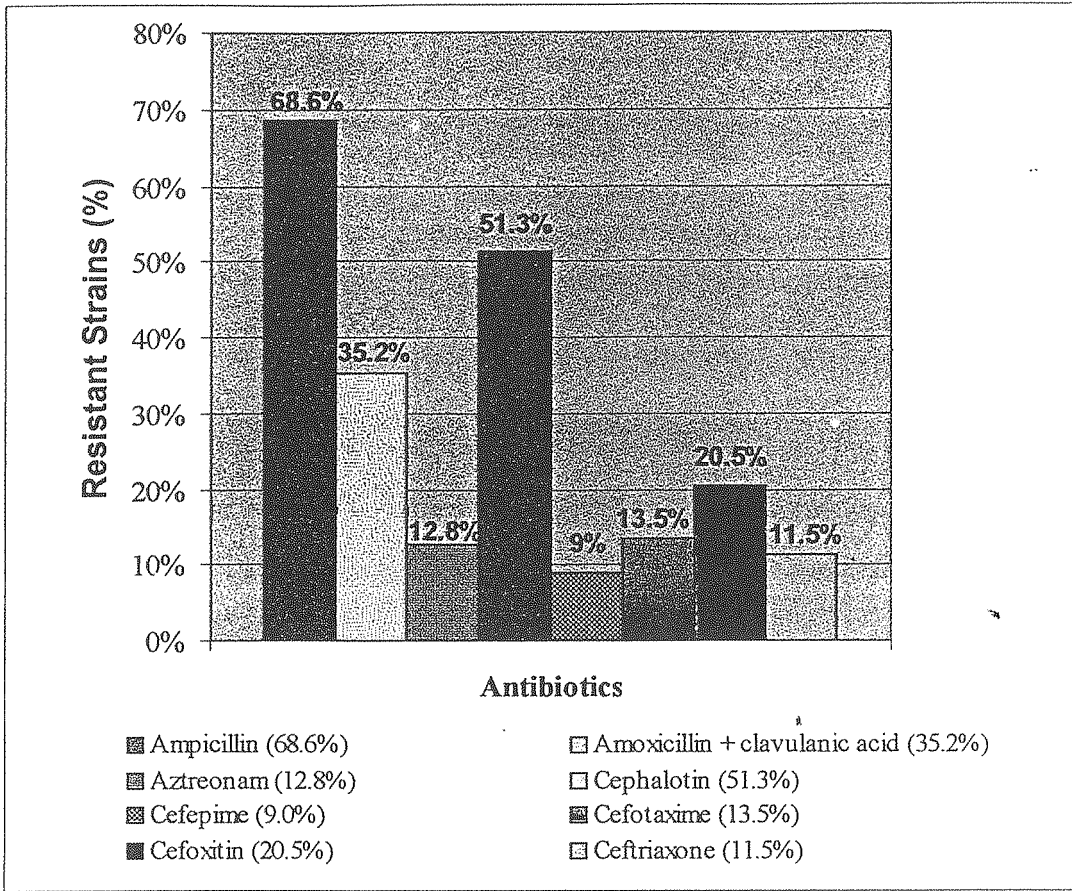


9. National Committee for Clinical laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. NCCLS, 6<sup>th</sup> ed. 1999.
10. Louie TJ, Bartlett JG, Tally FP, Gorbach SL. Aerobic and anaerobic bacteria in diabetic foot ulcers. *Ann Intern Med* 1976; 85:461-63.
11. Goldstein EJC, Citron DM, Nesbitt CA. Diabetic foot infection. *Diabetes Care* 1996; 19: 638-41.
12. Enne VI, Livermore DM, Stephensa P, Hall LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 2001; 357:1325-28.
13. Cars O, Mölstad S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet* 2001; 357: 1851-53.
14. Hart CA, Kariuki S. Antimicrobial resistance in developing countries. *BMJ* 1998; 317:647-50.
15. Livermore, D M.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and Clinical Resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8 : 557-84.
16. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
17. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Jin YT, Wu, JJ. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2  $\beta$ -Lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in Southern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4320-25.

18. Piroth L, Aubé H, Doile JM, Martin MV. Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: are  $\beta$ -lactamase inhibitors of therapeutic value? *Clin Infect Dis* 1998; 27:76-80.
19. Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ et al. Resistance to cefotaxime and seven other  $\beta$ -lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3 years survey in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1677-81.
20. Tenover FC, Hughes JM. The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply resistant bacterial pathogens. *JAMA* 1996; 275(4): 300-4.
21. Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detecting and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol* 1999; 37:4065-70.
22. Sader HS. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. *Braz J Infect Dis* 2000; 4(2)::91-99.
23. Gales AC, Bolmströn A, Sampaio J, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) isolated in Brazilian Hospitals. *Braz J Infect Dis* 1997; 1:196-203.



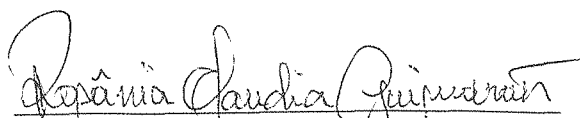
**FIGURE 1: Antimicrobial Resistance of 156 *Enterobacteriaceae* to Aminoglycosides, Sulfonamides, Quinolones, Chloramphenicol and Tetracycline.**



**FIGURE 2: Antimicrobial Resistance of 156 *Enterobacteriaceae* to Beta-lactams**

## DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que a tese intitulada "Pé diabético: estudo bacteriológico de 141 pacientes atendidos no Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão do Estado do Ceará", realizada pelo aluno Renato Motta Neto, do Mestrado em Patologia, pela Universidade Federal do Ceará - UFC, foi corrigida por mim, Rosânia Claudia Guimarães, e encontra-se dentro das normas gramaticais da L.P.



Registro LP-MEC 15.456

Proc. 23014.000819/94-11