

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E
MEDICINA INVESTIGATIVA**

TESE DE DOUTORADO

**DISTRIBUIÇÃO CLONAL DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS
EM INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO ADQUIRIDAS NA
COMUNIDADE NO PERÍODO DE 2001 A 2009 NA CIDADE DE
SALVADOR – BAHIA**

MARIA GORETH MATOS DE ANDRADE BARBERINO

Salvador - BA

2013

Maria Goreth M. A. Barberino

**DISTRIBUIÇÃO CLONAL DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS
EM INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO ADQUIRIDAS NA
COMUNIDADE NO PERÍODO DE 2001 A 2009 NA CIDADE DE
SALVADOR – BAHIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Epidemiologia Molecular e Medicina Investigativa.

Orientador: Dr. Edson Duarte Moreira Jr.

Co-orientadora: Dra. Joice Neves Pedreira

Salvador - BA

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Barberino, Maria Goreth Matos de Andrade
B234d Distribuição clonal de escherichia coli isoladas em infecções do trato urinário adquiridas na comunidade no período de 2001 a 2009 na cidade de Salvador-Bahia. [manuscrito] / Maria Goreth Matos de Andrade Barberino. - 2013.
115 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2013.
Orientador: Profº Drº.: Edson Duarte Moreira Júnior, Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística.

1. Infecção de trato urinário 2. Escherichia coli 3. Resistência bacteriana 4. Clonalidade de E.coli 5. Grupo clona A I.Título.


CDU 577.18:616.63


“DISTRIBUIÇÃO CLONAL DE ESCHERICHIA COLI ISOLADAS EM INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE NO PERÍODO DE 2001 A 2009 NA CIDADE DE SALVADOR - BAHIA”


MARIA GORETH MATOS DE ANDRADE BARBERINO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr^a Hygia Maria Nunes Guérreiro
Professora Adjunta
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública


Dr^a Suzana Ramos Ferrer
Professora Adjunta
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública


Dr. Luciano Kalabric Silva
Tecnologista em Saúde Pública
CPqGM/FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai (*in memorian*) pelo exemplo de amor, ética e honestidade.

A minha mãe Lia pelo exemplo de luta, amor e dedicação aos filhos.

Ao grande amor da minha vida e companheiro de todos os momentos: Ricardo Barberino.

Ao maior presente que a vida me deu: meus filhos Ludmila, Igor, Camila.

Meus irmãos José, Ivan e Zélia (*in memorian*)

Aos meus irmãos João, Tarcisio e minhas cunhadas Jacy e Rose, pelos ensinamentos, companheirismo e presença sempre constante na minha vida pessoal e profissional.

De forma especial ao meu orientador Dr. Edson Duarte que me deu oportunidade de traçar novos caminhos profissionais e que seguramente sem o seu incentivo eu não chegaria tão longe.

A minha co-orientadora, colega e amiga Joice Pedreira pelo carinho, persistência e paciência para terminar este estudo.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pela oportunidade de aprender.

A equipe do LEMB pela amizade e apoio, em especial a Tatiane.

Aos colegas e amigas que me ajudaram nas etapas mais difíceis: Maíra e Soraia.

A Jailton pela disponibilidade em me auxiliar sempre que solicitei.

Aos amigos que sempre incentivaram o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos infectologistas que contribuíram com suas experiências clínicas a enriquecer a minha formação em Microbiologia.

A minha querida professora Hygia que me ensinou os primeiros passos da Microbiologia.

As equipes dos serviços de Microbiologia sob a minha coordenação: Hospital Professor Edgard Santos – UFBA e Hospital São Rafael.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

Dalai Lama

RESUMO

Distribuição clonal de *Escherichia coli* isoladas em infecções do trato urinário adquiridas na comunidade no período de 2001 a 2009 na cidade de Salvador - Bahia

Maria Goreth Matos de Andrade Barberino

Orientador: Dr. Edson Duarte Moreira Junior

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia

Introdução: A infecção do trato urinário (ITU) é considerada a segunda infecção mais comum em humanos, estima-se que ocorram cerca de 150 milhões de casos de ITUs por ano no mundo. O aumento das taxas de resistência aos antimicrobianos entre os uropatógenos tem tornado mais difícil o tratamento das ITUs. **Objetivo:** Determinar a distribuição clonal das cepas de *E. coli* isoladas em pacientes com ITU adquirida na comunidade de acordo com o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e avaliar o papel dos grupos clonais na disseminação e persistência da resistência nestas infecções. **Métodos:** Foram isoladas 874 cepas de *E. coli* em pacientes com ITU, procedentes de unidades ambulatoriais em três hospitais na cidade de Salvador–Ba, no período de 2001 a 2009. O perfil de susceptibilidade foi determinado por microdiluição em placa (Microscan-Siemens®). Nas amostras selecionadas para genotipagem (n=275), a identificação dos grupos clonais foi realizada pela comparação dos padrões de PFGE, utilizando os critérios de Tenover (1995). Em todas as etapas do estudo foi utilizada como controle de qualidade a cepa ATCC *E. coli* 25922. **Resultado:** Entre os antibióticos testados, a maior prevalência de resistência foi encontrada para ampicilina (AMP) (49%), cefalotina (12-33%) e sulfametoxazol-trimetropin (SXT) (36-42%). A taxa de resistência à ciprofloxacina (CIP) variou de 9 a 14%. Na análise da distribuição clonal, segundo os fenótipos de resistência aos antimicrobianos, encontramos maior predomínio de um grupo clonal CgA (63%) entre as cepas consideradas multidroga resistentes. Diferentemente das amostras com algum grau de resistência ou multi-sensíveis, nas quais observamos diversidade clonal. **Conclusão:** A alta prevalência de resistência a SXT, AMP e cefalotina contraindica o uso destes antimicrobianos no tratamento empírico das ITU adquiridas na comunidade. A taxa de resistência à CIP relativamente alta, alerta para o aumento e disseminação de resistência a este antimicrobiano na comunidade. Isto irá dificultar e onerar o tratamento destas infecções. Observamos a surgimento de um grupo clonal (CgA) no período final do estudo (2008 a 2009) associado às cepas multidroga resistentes. Este achado sugere que a expansão de determinados clones pode ter um papel importante na disseminação de resistência bacteriana em ITUs adquiridas na comunidade.

Palavras-chave – 1. Infecção do trato urinário. 2. *Escherichia coli*. 3. Resistência bacteriana. 4. Clonalidade de *E. coli*. 5. Grupo clonal A.

ABSTRACT

Clonal distribution of community acquired Escherichia coli isolated from urinary tract infections from 2001 to 2009 in the city of Salvador – Bahia - Brazil

Maria Goreth Matos de Andrade Barberino

Advisor: Dr. Edson Duarte Moreira Junior

Thesis (Ph.D. in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia

Introduction: Urinary tract infection (UTI) is considered the second most common infection in humans. It is estimated that there are about 150 million cases of UTIs per year worldwide. Increasing rates of antimicrobial resistance among uropathogens challenges UTI treatments. **Objective:** To determine the distribution of clonal strains of *E. coli* isolated from patients with community-acquired UTI according to the profile of antimicrobial susceptibility; and to evaluate the role of clonal groups in the spread and persistence of resistance in these infections. **Methods:** Eight hundred seventy four strains of *E. coli* were isolated from patients with UTI, coming from outpatient clinics in three hospitals in the city of Salvador - Bahia, from 2001 to 2009. The susceptibility profile was determined by broth microdilution method (Siemens - Microscan®). The samples selected for genotyping (n = 275) were identified for clonal groups by comparing the patterns of PFGE, using the criteria of Tenover (1995). All study stages were quality control by strain *E. coli* ATCC 25922. **Results:** Among the antibiotics tested, the highest prevalence of resistance was for ampicillin (AMP) (49%) followed by trimethoprim - sulfamethoxazole (SXT) (36-42%) and for cephalothin (12-33%). The rate of resistance to ciprofloxacin (CIP) ranged between 9-14 %. In the Clonal Analysis distribution, performed according to antimicrobial resistance phenotypes, we found a higher prevalence of a clonal group CgA (63%) among multidrug resistant strains. This result differs from samples with some degree of resistance or multi-sensitive in which we observed clonal diversity. **Conclusion:** The high prevalence of resistance to SXT, AMP, and cephalothin contraindicate the use of these antibiotics in the empirical treatment of community-acquired UTI. The relatively high rate of resistance to CIP, raises attention to the increase and spread of antimicrobial resistance in this community and potentially complicate and encumber the treatment of these infections. We observe the emergence of a clonal group (CgA) in the final period of the study (2008-2009) associated with multidrug resistant strains. This finding suggests that the expansion of particular clones may have an important role in the spread of bacterial resistance in community-acquired UTI.

Keywords - 1. Urinary tract infection. 2. Escherichia coli. 3. Bacterial resistance. 4. *E. coli* clonality. 5. Clonal group A

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência (%) de resistência antimicrobiana em 463 *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário adquirida na comunidade estratificado por sexo, Salvador, Bahia, 2001 a 2002.....77

Tabela 2. Prevalência (%) de resistência antimicrobiana em 411 *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário adquirida na comunidade estratificado por sexo, Salvador, Bahia, 2008 a 2009.....78

Tabela 3. Prevalência (%) de resistência a antimicrobianos em cepas de *E. coli* isoladas em pacientes com infecção do trato urinário adquirida na comunidade em Salvador, comparação de dois períodos: 2001 a 2002 e 2008 a 2009.....79

Tabela 4. Distribuição (%) de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas em pacientes com infecção do trato urinário adquiridas na comunidade, Salvador, Bahia, 2000 a 2001 (n=463) e 2008 a 2009 (n=411).....79

Tabela 5. Distribuição clonal das cepas de *Escherichia coli* multidroga resistentes (MDR) isoladas em pacientes com infecção do trato urinário na comunidade, Salvador, Bahia, 2001 a 2009.....84

Tabela 6. Distribuição clonal (%) de 100 cepas de *Escherichia coli* sensíveis a ciprofloxacina e resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim isoladas de ITU-AC, Salvador, Bahia, 2001 a 2009.....86

Tabela 7. Distribuição clonal (%) de 100 cepas de *Escherichia coli* sensíveis a todos antimicrobianos isoladas em pacientes com ITU-AC no período de 2001 a 2009, Salvador, Bahia.....88

Tabela 8. Distribuição clonal de 145 cepas de *Escherichia coli* isoladas de ITU-AC, de acordo com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, Salvador, Bahia, 2001 a 2002.....90

Tabela 9. Distribuição clonal de 130 cepas de *Escherichia coli* de acordo com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, isoladas de ITU-AC no período de 2008 a 2009, Salvador, Bahia.....92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Patogenia da ITU causada por UPEC em seus diferentes estágios.....40
- Figura 2.** Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos antimicrobianos.....45
- Figura 3.** Fluxograma das amostras selecionadas aleatoriamente para realização de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....73
- Figura 4.** Distribuição do número de amostras de *E. coli* selecionadas inicialmente para realização de PFGE e do número final de amostras tipadas.....80
- Figura 5.** Padrões de PFGE (Xbal) das 275 cepas de *Escherichia coli*, Salvador, 2001 a 2009.....82
- Figura 6.** Padrões de PFGE (Xbal) de 75 cepas de *Escherichia coli* apresentando multidroga resistência, Salvador, 2001 a 2009 (em destaque os principais grupos clonais).....85
- Figura 7.** Padrões de PFGE (Xbal) de 100 cepas de *Escherichia coli* apresentando sensibilidade à ciprofloxacina e resistência à sulfametoxazol-trimetoprim, Salvador, 2001 a 2009 (em destaque os principais grupos clonais).....87
- FIGURA 8.** Padrões de PFGE (Xbal) de 100 cepas de *Escherichia coli* apresentando sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, Salvador, 2001-2009 (em destaque os principais grupos clonais).....89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
AmpC	AmpC β -lactamase
APEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica Aviária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATMs	Antimicrobianos
BHI	Brain Heart Infusion
CF	Cefalotina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cg	Grupo Clonal
CIP	Ciprofloxacina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DAEC	<i>E. coli</i> Difusa Aderente
DEC	<i>E. coli</i> Diarreiogênica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica

EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
ExPEC	<i>E. coli</i> Patogênica Extra-intestinal
FVs	Fatores de Virulência
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
ITU	Infecção do Trato Urinário
ITU-AC	Infecção Urinária Adquirida na Comunidade
ITUs	Infecções do Trato Urinário
LT	Termo-lábil
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mL	Mililitro
MRSA-AC	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina da Comunidade
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina

NMEC	<i>E. coli</i> Relacionada à Meningite Neonatal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAIs	Ilhas de Patogenicidade
PBPs	Proteínas de Ligação de Penicilina
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PUE	Proteína Uropatogênica Específica
SADI	Sociedade Americana de Doenças Infecciosas
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ST	Termo-estável
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
SXT	Sulfametoxazol+Trimetoprim
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UPEC	<i>E. coli</i> Uropatogênica
VRE	Enterococos Resistentes à Vancomicina

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO	16
1.1 – <i>Escherichia coli</i>	16
1.2 – Principais grupos de <i>Escherichia coli</i>	18
1.2.1– Grupo Intestinal (diarreiogênico).....	18
1.2.2 – Grupo Extra-intestinal (ExPEC)	22
1.3 – Infecção do trato urinário (ITU)	32
1.3.1 – Epidemiologia das ITUs	34
1.3.2 – Patogênese.....	38
1.3.3 – Aspectos Microbiológicos das ITUs	41
1.3.4 – Resistência Bacteriana	42
1.3.4.1 – Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos	44
1.3.4.2 – Disseminação da Resistência Bacteriana	53
1.3.4.3 – Pressão Seletiva dos Antimicrobianos.....	55
1.3.5 – Epidemiologia Molecular	63
1.3.5.1 – Teste Genotípico para Avaliação de Clonalidade	64
1.3.5.2 – Clonalidade das Amostras de <i>E. coli</i>	65
1.3.5.3 – Distribuição Clonal de Cepas de <i>E. coli</i> em ITU	65
2.0 – RACIONAL	70
3.0 – OBJETIVOS	71
3.1 – Objetivo Geral	71
3.2 – Objetivos Específicos	71
4.0 – METODOLOGIA	72
4.1 – Local de Estudo	72

4.2 – Desenho do Estudo	72
4.3 – População	72
4.3.1 – Critérios de Inclusão	72
4.3.2 – Critérios de Exclusão	72
4.3.3 – Escolha dos Isolados para Subtipagem.....	73
4.4 – Manutenção das Amostras de <i>E. coli</i>	74
4.5 – Genotipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado - (PFGE)	74
4.5.1 – Definição de Grupo Clonal.....	75
4.5.2 – Análise Estatística (PFGE)	75
4.6 – Considerações Éticas	75
5.0 – RESULTADOS	76
6.0 – DISCUSSÃO	93
7.0 – MÉRITOS E LIMITAÇÕES	100
8.0 – CONCLUSÕES	101
9.0 – REFERÊNCIAS	103

1.0 – INTRODUÇÃO

1.1– *Escherichia coli*

É uma bactéria pertencente à Família Enterobacteriaceae, anaeróbia facultativa, Gram negativa, não formadora de esporos, móvel ou imóvel. É um micro-organismo tido como habitante natural da microbiota do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente, entretanto, 10% é capaz de causar doenças intestinais e extra-intestinais (SANTOS et al., 2009). Coloniza o trato gastrointestinal do homem, logo após o nascimento e pode causar doenças em imunocomprometidos ou em caso de agressão do trato gastrointestinal. A razão para esta relação entre a *E. coli* e o seu habitat, localizado essencialmente no cólon, é provavelmente pela sua capacidade de utilização do gluconato presente no cólon. Entretanto, é descrito que existem clones de *E. coli* que ao longo do tempo podem adquirir capacidade de virulência, podendo causar doenças em indivíduos saudáveis (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

É considerada a espécie de bactéria mais versátil entre as enterobactérias, e mais frequentemente isoladas em cultura de fezes e urina, além de ser o agente mais frequente isolado nas infecções diarreicas e infecção do trato urinário (GOETTSCHE et al., 2000) Cepas patogênicas de *E. coli* intestinal são raramente encontrados nas fezes de indivíduos saudáveis e normalmente não causam doença extra-intestinal (CLERMONT et al., 2011).

O processo evolutivo tem como resultado a seleção de linhagens de *E. coli* com diferentes potenciais infecciosos. Observando através de uma perspectiva da capacidade patogênica, na maioria das vezes, as cepas que causam infecção intestinal, não causam doenças extra-intestinais e vice-versa. A base genética para esta dicotomia clínica tem sido compreendida na última década (RUSSO; JOHNSON, 2003).

Os isolados de *E. coli* de importância para os seres humanos, são classificadas em três grupos, segundo, a genética e critérios clínicos: comensais, patogênicas intestinais e patogênicas extra-intestinais. A *E. coli* comensal difere evolutivamente da

E. coli patogênica por não apresentar, em seu genoma, os genes que codificam os fatores de virulência. Tanto as infecções consideradas intestinais como as extra-intestinais são causadas por cepas que albergam numerosos fatores de virulência (FVs) localizados em plasmídeos, bacteriófagos ou no cromossomo bacteriano. Vários estudos têm mostrado que cepas de *E. coli* patogênicas podem ser derivadas de cepas comensais por aquisição cromossômica ou extra cromossômica de operons de virulência (JOHNSON; KUSKOWSKI, 2000; DURIEZ et al., 2001).

As cepas patogênicas têm ao longo dos anos, evoluído e adquirido a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal, urinário e até causar doenças invasivas, provavelmente através de elementos genéticos (plasmídeos, fagos, transposons) que as tornam capazes de adaptarem em hospedeiros distintos. Esta plasticidade genômica pode ser responsável pela capacidade de colonizar, multiplicar e causar danos em ambientes diversificados (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Em 1984, Ochman e colaboradores, estudando as variantes de *E. coli* classificaram em seis grupos filogenéticos baseando-se no polimorfismo eletroforético das esterases e outras enzimas. Estes grupos foram designados: A, B1, B2, C, D e E. Outros estudos genômicos, realizados por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) também mostraram que amostras de *E. coli* apresentavam variabilidade. A análise demonstra que os grupos comensais (não patogênicas) estão associados aos grupos filogenéticos A e B1, e diferem das cepas patogênicas por não possuírem determinantes de virulência especializados, que causam infecções intestinais ou extra-intestinais. Já as amostras patogênicas intestinais se agrupam de forma similar nos grupos A, B1 e D. Diferentemente, destes dois grupos, as extra-intestinais são procedentes, em sua maioria, dos filogrupos B2 e D (SANTOS et al., 2009; KATOULI, 2010).

Entre estes grupos filogenéticos, isolados de *E. coli* têm sido relacionados a uma ampla gama de doenças que afetam animais ou seres humanos em todo o mundo. Até o momento, oito espécies e seus mecanismos de doença têm sido estudadas (JOHNSON; KUSKOWSKI, 2000; CROXEN; FINLAY, 2010).

1.2 – Principais grupos de *Escherichia coli*

A aquisição de elementos genéticos móveis, tais como: fagos, plasmídeos, desempenham um papel importante na evolução de diferentes clones de *E. coli* comensais e surgimento de *E. coli* patogênicas, associadas a quadros específicos. A partir destas modificações são conhecidos dois grupos de *E. coli* (diarreiogênico e extra-intestinal) (AHMED et al., 2008).

A diversidade fenotípica observada entre os grupos de *E. coli*, é resultado de um grande número de combinações de genes. Entretanto, apesar do elevado grau de fluxo de genes, a estrutura desta população permanece em sua maioria clonal, e seis grupos filogenéticos bem definidos (A, B1, B2, D, E e F). Embora, não se conheça o suficiente sobre as relações entre estes grupos e a especificidade dos hospedeiros, apesar de amplamente descritos nos estudos baseados em diversas técnicas (sorotipagem, *Multilocus Sequence Typing* (MLST), perfis de proteínas externas, PFGE, ribotipagem e estudo de genes de virulência) que tem demonstrado certo grau de relação entre isolados humanos e animais (CLERMONT et al., 2011).

1.2.1 – Grupo intestinal (diarreiogênico)

As principais doenças intestinais ou diarreicas são causadas por patógenos intestinais, denominados como DEC (*Diarrheagenic Escherichia coli*) (AHMED et al., 2008). O grupo de *E. coli* diarreiogênica, é classificado em seis diferentes subgrupos, de acordo com os fatores de virulência específicos. A presença destes fatores de virulência determinam as características epidemiológicas e patológicas das síndromes diarreicas distintas. Além desses fatores citados, outros são descritos como importantes nesta separação dos grupos, tais como: modo de transmissão, características do hospedeiro infectado, sorotipos e sorogrupos, fenótipos de interação com células epiteliais intestinais e patogenicidade. Baseando-se nestas características e presença destes fatores descritos, são reconhecidos diferentes grupos de *E. coli* denominadas enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênia (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e enterohemorrágica (EHEC), esta última sendo associada à síndrome hemolítica urêmica: SHU (SANTOS et al., 2009; COSTA et al., 2010).

E. coli enteropatogênica (EPEC)

É reconhecida como não produtora de toxina Shiga e como sendo associada principalmente com diarreia esporádica, embora raros surtos tenham sido descritos. Estes surtos são associados à ingestão de alimentos ou água contaminados, sendo descritos em pessoas de qualquer idade. Entretanto, a maioria dos casos envolvem crianças abaixo de seis meses em países em desenvolvimento. No adulto, apesar de ser parte da microbiota intestinal, não expressa os sintomas da doença, possivelmente por aquisição de imunidade (CROXEN; FINLAY, 2010; WANKE, 2012).

O mecanismo de patogenicidade é provavelmente secundário a três etapas: aderência às células epiteliais intestinais, destruição das microvilosidades com secreção de proteínas e posterior adesão aos enterócitos do intestino delgado, induzindo a lesão discreta e levando ao desarranjo do citoesqueleto, ocasionando uma resposta inflamatória e diarreia (DOYLE, 1991; WANKE, 2012).

E. coli enterohemorrágica (EHEC)

É um patógeno associado a zoonoses, sendo os animais de criação, principalmente bovinos reconhecidos como reservatórios, podendo ainda, ser encontrado em uma variedade de outros ruminantes.

Os surtos em geral, são associados ao consumo de carne mal cozida, leite, alface, frutas entre outros. A facilidade de ocasionar surtos deve-se a necessidade de uma dose infectante muito pequena (<100 células). Estes surtos já foram descritos no Japão, Reino Unido e Estados Unidos (EUA), onde se estima que são notificados anualmente mais de 75.000 casos de infecção humana e 17 surtos/ano. Entre estes casos, cerca de 5% evoluem para óbito, devido à SHU (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; BÉLANGER et al., 2011).

O mecanismo de patogenicidade ocorre por indução da fixação da bactéria, com uma discreta lesão no cólon. Apresenta a capacidade de expressar a toxina Shiga, podendo levar a absorção sistêmica e chegar ao rim, onde afeta as células renais e endoteliais, devido a combinação de toxinas, citotoxinas e quimiocinas, que ocasionam anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal aguda, ou seja,

síndrome hemolítica urêmica (SHU), podendo evoluir para insuficiência renal aguda e fatal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; WANKE, 2012).

E. coli enterotoxigênica (ETEC)

O grupo ETEC provoca diarreia aquosa em humanos e outros mamíferos jovens, além de indivíduos idosos, que pode variar desde um quadro leve, diarreia autolimitante a uma doença grave (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Este grupo de *E. coli*, pode sobreviver em água e alimentos, sendo considerada uma das causas bacteriana mais comum em desidratação de crianças menores de dois anos, especialmente, em países em desenvolvimento. Outra forma de diarreia descrita associada a este grupo é a diarreia do viajante, que ocorre preferencialmente em regiões tropicais, em indivíduos expostos à água e alimentos contaminados em regiões onde o saneamento básico é inadequado. Um inóculo relativamente grande é necessário para produzir doença; portanto, a transmissão de pessoa a pessoa não é significativo para este organismo. Atualmente os relatos apontam para emergência do grupo ETEC como causadores de diarreia em regiões desenvolvidas (KATOULI, 2010; WANKE, 2012).

Quanto a sua patogênese, a ETEC após a transmissão e invasão no hospedeiro, adere aos enterócitos, elabora os fatores de virulência, sendo as fimbrias responsáveis por esta adesão e indução de uma diarreia aquosa pela secreção de enterotoxina termo lábil (LT), que é relacionada com a toxina da cólera e / ou toxina estável ao calor (ST), associada com a doença humana (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A doença tem um curto período de incubação, em geral, menos de dois dias antes do início dos sintomas e os principais sinais clínicos são: náuseas, cólica abdominal, vômitos e diarreia aquosa. Em viajantes a doença é autolimitada, durando três a cinco dias, sendo considerada mais grave em crianças menores de cinco anos, que residem em países em desenvolvimento (WANKE, 2012).

E. coli enteroinvasiva (EIEC)

Este grupo apresenta uma semelhança bioquímica, genética e patogênica com a *Shigella* spp. O mecanismo da doença ocorre pela invasão da célula do epitélio intestinal (cólon), que lisa o fagossoma e através de movimentos da célula por nucleação dos filamentos de actina, move-se lateralmente através do epitélio por disseminação célula-a-célula, provocando ulcerações no cólon. Os mesmos genes parecem facilitar a patogênese de ambos EIEC e *Shigella* spp. (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Trata-se de uma infecção clínica pouco comum, embora subdiagnosticada. A sintomatologia é caracterizada por diarreia aquosa, podendo ser ou não sanguinolenta, o paciente ainda pode apresentar calafrios e dores abdominais. Aproximadamente 11 sorotipos são responsáveis por infecções de EIEC e o principal deles é O:124 (WANKE, 2012).

E. coli enteroagregativa (EAEC)

EAEC foi descrita em 1980, isolada em pacientes com diarreia, após realização de testes de aderência em células Hep-2 e observação de adesão em cascata, quando se realizava cultura de células. A EAEC é considerada o segundo agente mais frequentemente isolado em pacientes com diarreia do viajante, sendo superada apenas pela ETEC em populações de países em desenvolvimento e industrializados. Também tem sido reconhecida como causa de diarreia endêmica e epidêmica, principalmente em crianças, viajantes, além de ser associada com diarreia persistente em adultos com infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; WANKE, 2012).

A patogênese da diarreia causada por este grupo, ainda não é bem entendida, sabe-se apenas que são capazes de induzir a liberação de interleucina (IL)-8. Outros mecanismos prováveis são: adesão ao epitélio do intestino delgado e intestino grosso formando um biofilme espesso, liberando enterotoxinas secretoras e citotoxinas, provavelmente pela presença de fimbrias de aderência e destruição da mucosa (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; WANKE, 2012).

E. coli difusa aderente (DAEC)

É considerado um grupo heterogêneo, que apresenta um padrão difuso de aderência em células HeLa e células Hep-2. Também produz em sua maioria (80%) adesinas fimbriais que utilizam proteínas celulares de superfície com função de proteção das células contra os danos do sistema complemento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Colonizam o intestino delgado e têm sido implicadas na diarreia em crianças maiores 12 meses, além de infecções do trato urinário (ITUs) recorrentes em adultos. A maioria dos autores reconhece a DAEC como uma categoria independente de *E. coli* potencialmente diarreiogênica (JAMES, 1998; SERVIN, 2005).

A DAEC induz um efeito de transdução de sinal característico nos enterócitos do intestino delgado que se manifesta como o crescimento de longo dedo como projeções celulares, que contornam as bactérias (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Dados epidemiológicos mostram que a depender do tipo de adesinas que as cepas de DAEC expressam, elas podem estar envolvidas em 25 a 50% dos casos de cistite em crianças e 30% dos casos de pielonefrite em mulheres grávidas ou podem ser associadas com um aumento do risco de uma segunda ITU, sugerindo a sua possível associação com ITU recorrente ou crônica (SERVIN, 2005).

1.2.2 – Grupo extra-intestinal (ExPEC)

E. coli patogênica extra-intestinal (ExPEC)

Com base no sítio de isolamento e não nas características filogenéticas, existe um importante grupo de *E. coli* denominado extra-intestinal (ExPEC) que causa diversas doenças infecciosas, tais como: meningites neonatais (MNEC), bacteremia, osteomielite, feridas, celulite, infecções intra-abdominais e as uropatogênicas (UPEC) associadas à cistite, pielonefrite e prostatite e por fim, as amostras isoladas de infecções em aves, denominadas (APEC), responsáveis por septicemia, pneumonia, pericardite com significativa morbidade e mortalidade, além dos consequentes agravos econômicos e perdas para indústria avícola (JOHNSON; RUSSO, 2002; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; SANTOS et al., 2009; BÉLANGER et al., 2011).

As cepas de ExPEC são genicamente e epidemiologicamente distintas das cepas comensais e patogênicas intestinais. Elas não produzem doença entérica, entretanto, podem colonizar assintomaticamente trato intestinal de até 20% dos indivíduos normais (JOHNSON et al., 2002).

Apesar da capacidade de colonização prolongada e assintomática nos seres humanos e de apresentarem um comportamento de virulência, as ExPEC são capazes de causar doenças apenas quando saem do intestino e vão para um sítio primariamente estéril do corpo, causando infecções em diversos locais anatômicos através da entrada em um sítio extra-intestinal estéril a partir de seu locus de colonização (cólon, vagina, orofaringe).

Entre as infecções adquiridas na comunidade causadas por ExPEC, a ITU associada às cepas de *E. coli* tipo UPEC, é considerada a mais frequente, acometendo principalmente mulheres na idade reprodutiva. ITU é considerada como a principal causa de morbidade, mortalidade e custos associados aos cuidados de saúde, sendo avaliada como a segunda maior causa de infecção bacteriana, tanto na comunidade como nos hospitais (JOHNSON et al., 2002). Também a ExPEC é tida como a principal causa de bacteremia por Gram negativos, seja nas infecções comunitárias ou hospitalares. No ambiente hospitalar está entre os principais agentes que elevam a morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos e expostos a procedimentos invasivos, além de acarretar um aumento no uso de antibióticos (SANTOS et al., 2009).

As infecções extra-intestinais causadas por *E. coli* são responsáveis por milhões de episódios de ITUs no mundo, sendo responsável por 90% de todas as infecções adquiridas na comunidade e, aproximadamente, 50% das infecções nosocomiais do trato urinário. Anualmente são notificadas cerca de 36.000 mortes por sepse, além de custar aos EUA bilhões de dólares (JOHNSON; MURRAY, A. C. et al., 2005; CAO et al., 2011). O tratamento das infecções associadas à ExPEC vem se tornando cada vez mais complexo pela emergência e disseminação da resistência aos antimicrobianos (ATMs) recomendados, tais como: fluoroquinolonas, β -lactâmicos e SXT (GIUFRE et al., 2012).

Embora a ExPEC seja considerada um importante patógeno, associado a uma diversidade de infecções e apesar de sua grande importância, estas infecções não

são alvo de atenção pública quanto as causadas pela *E. coli* enteropatogências, especialmente a *E. coli* O157-H7, provavelmente devido à não comprovação da associação das ExPEC com alimentos contaminados, além do fato das ITUs serem, em sua maioria, associados à menor morbidade, levando as unidades de saúde a ter sua atenção voltada para detectar e reportar infecções causadas por *E. coli* intestinais (JOHNSON; RUSSO, 2002; DEZFULIAN et al., 2003).

A evolução das cepas de ExPEC não é bem compreendida, embora a presença de numerosos fatores de virulência extra-intestinais e o fato de pertencer aos grupos filogenéticos B2 e D pode ser responsável pelo desenvolvimento de clones virulentos, provavelmente através de transferência horizontal de FVs, com a capacidade de converter clones comensais em virulentos, podendo induzir infecções extra-intestinais em portadores imunocomprometidos ou não (JOHNSON; RUSSO, T. A., 2002; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

A incidência de doenças induzidas pelo ExPEC aumenta com a idade dos pacientes; por conseguinte, o aumento demográfico na população idosa em todo o mundo indica que pode haver um correspondente aumento da incidência das doenças extra-intestinais induzidas por *E. coli* (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

A identificação no futuro, de outros reservatórios relevantes e vias de transmissão para ExPEC, pode evitar que indivíduos vulneráveis sejam expostos a estas cepas. Além do bloqueio da colonização intestinal por ExPEC, que pode reduzir o risco de exposição de outros sítios corpóreos (JOHNSON et al., 2002).

Fatores de virulência em (ExPEC)

Os fatores de virulência determinam a invasão de uma cepa no hospedeiro e também são responsáveis pela sobrevivência de um micro-organismo em ambientes menos favoráveis, como a urina. Vários são os FVs que colaboram com a sobrevivência da *E. coli*, no trato gastrointestinal e persistência em sítios extra-intestinais onde podem causar infecção. Estes incluem adesinas que são importantes na colonização e proliferação do micro-organismo e início da infecção (P-pili, e fimbria tipo 1), toxinas (hemolisina, fator necrosante citotóxico e toxina citoletal), antígenos de superfície (cápsulas do grupo II e grupo III e lipopolissacarídeo), invasinas (invasão do endotélio cerebral, Ibe10), sistemas de

captação do ferro (aerobactin, que são receptores de ferro localizados na superfície externa da bactéria e tem sido associado com 45-78% das UPECs) e sistemas de secreção (sistemas de secreção do tipo III). Estes fatores de virulência facilitam a colonização e invasão das superfícies das mucosas comprometendo os mecanismos de defesa do paciente e estimulando uma resposta inflamatória nociva para o hospedeiro (JOHNSON et al., 2002; DEZFULIAN et al., 2003; KATOULI, 2010).

Apesar da onipresença de FVs comuns entre isolados clínicos de diferentes síndromes e cepas patogênicas e comensais, os FVs do tipo fimbrias são os mais comumente ligados aos isolados de *E. coli* de pacientes com cistites. Tradicionalmente, ExPEC têm sido estudadas em síndromes clínicas, com a suposição de que diferentes clones e os associados FVs são melhores na capacidade de causar doença em determinados sítios anatômicos e determinadas populações. A delimitação dos FVs de ExPEC e elucidação dos mecanismos de ação podem permitir o desenvolvimento de intervenções específicas na virulência do patógeno, prevenindo doenças (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

Considerando que a ExPEC constitui uma ameaça à saúde, esforços tem sido praticados na tentativa de entender e identificar novos tipos de FVs através de sequenciamento do genoma da *E. coli*. A identificação de sequências presentes em agentes patogênicos é de grande contribuição para elucidação da dinâmica das ITUs (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

ExPEC em alimentos

Apesar das infecções extra-intestinais causadas por *E. coli* não serem geralmente associadas a surtos, evidências mostram que ExPEC podem ser responsáveis por alguns surtos, a exemplo do surto descrito na Califórnia em 2001, onde um grupo clonal foi associado a ITU na comunidade, com 49% dos isolados resistentes a SXT. Estes isolados apresentando esta resistência também foram encontrados em Michigan, Minnesota, Colorado e vários outros estados norte americanos. Outros surtos provocados por ExPEC tem sido descritos no sul de Londres, Dinamarca, Canadá, causando ITU por *E. coli* com resistência mais ampliada, devido à produção de beta-lactamase do tipo ESBL (Beta-lactamase de espectro estendido). A identificação dessas cepas em surtos sugeriu que fontes

ambientais, provavelmente carne e outros alimentos contaminados, poderiam desempenhar um papel relevante na propagação de *E. coli* geneticamente relacionadas (MANGES, et al., 2001).

Em Minnesota, Johnson e colaboradores (2005), realizaram culturas de 1648 amostras de itens alimentares para avaliar a prevalência de *E. coli*. Ao final do estudo encontraram *E. coli* (9%) em aves e outros alimentos, carne de boi ou porco (69%) e galinhas de capoeira (92%). O maior número de isolados de ExPEC na carne pode ser explicado pela contaminação de carcaças de animais com microbiota fecal do hospedeiro, no processo de abate, processamento e uso de ATMs na produção de alimentos de origem animal. Os autores concluíram que os alimentos vendidos no varejo foram contaminados com ExPEC resistente aos ATMs, deduzindo trata-se de uma situação preocupante devido o aumento da prevalência de resistência dos isolados de *E. coli* nas infecções clínicas (JOHNSON et al., 2005).

Nos EUA Rodriguez-Siek e colaboradores (2005), analisaram 451 isolados de APEC e observaram que a maioria das cepas compartilhavam características de virulência associadas com cepas ExPEC. Além disso, comparando 524 isolados de APEC com 200 amostras de UPEC, constataram que os dois grupos apresentaram sobreposição importante de sorogrupos, grupos filogenéticos e de genótipos de virulência, incluindo a presença de certos genes associados com grandes plasmídeos transmissíveis da APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

No Canadá, estudo realizado por Vincent e colaboradores (2010) também sugeriu que os alimentos podem ser fonte de *E. coli* apresentando resistência antimicrobiana. Derivados de carnes e aves de abate podem ser contaminados com *E. coli* de origem animal, durante o abate, incluindo as que expressam antígenos de ExPEC. Se há um reservatório de *E. coli* na alimentação dos animais, então a utilização de ATMs na ração animal, pode selecionar espécies resistentes aos ATMs. Além disso, ligações entre resistência antimicrobiana e cepas específicas de ExPEC em produtos de origem animal, em especial carne de frango e cepas isoladas em ITUs têm sido observado, levantando a hipótese de que carne de frango é o principal reservatório de *E. coli* que causa infecções extra-intestinais em humanos (JOHNSON et al., 2005; VINCENT et al., 2010).

Outro estudo realizado em Québec (Canadá), onde foram avaliadas 1.561 amostras de *E. coli* isoladas a partir de animais em abatedouros e carne vendida no varejo (bovinos 20%, galinhas 60% e 20% suínos) e seres humanos com ITU, em um período de dois anos, identificou entre as amostras de carne a varejo, 15 grupos clonais distintos, compreendendo 63 isolados (22 humanos com ITU, 41 de carnes, entre elas 71% de frangos). Nas amostras de abatedouro foram encontrados oito grupos clonais, entre 46 isolados de *E. coli* (17 de humanos e 29 de animais, entre elas 79% eram de frangos). Com a predominância dos isolados em carne de frango, concluíram que outras carnes (boi, porco) apresentavam isolados menos prováveis de ser clonais como os isolados de *E. coli* em ITU em humanos. Além de verificar através de testes moleculares (MLST, ERIC2 - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) que amostras humanas e amostras fecais de frangos em abatedouros poderiam pertencer ao mesmo grupo clonal.

Os autores sugerem que ExPEC isoladas de fontes de alimento de origem animal, especialmente frangos, podem ser implicadas em infecções de seres humanos e enfatizam a possibilidade de que ExPEC causadoras de ITUs e outras infecções extra-intestinais em humanos poderiam ser originadas de um reservatório alimentar animal, e alertam que novas intervenções poderiam ser necessárias para reduzir o nível de contaminação de alimentos assim como o risco de transmissão (BERGERON et al., 2012).

Colonização humana por ExPEC

A ExPEC coloniza cerca de 20% das pessoas saudáveis, podendo colonizar o intestino de forma estável sem causar infecção. Parte das cepas de *E. coli* desvia o seu estado comensal como microbiota intestinal e assume um curso mais patogênico com a capacidade de causar a doença, intestinal e extra-intestinal. A colonização em si não é suficiente, existe a necessidade de que a bactéria alcance um sítio extra-intestinal com condições de aumentar a sobrevivência e transmissão entre os hospedeiros, que se dá através dos fatores de virulência específicos que podem colonizar a área periuretral e o trato urinário. Esta diversidade entre as cepas de *E. coli* geralmente são associados à presença de uma variedade de ilhas de

patogenicidade (IPAs), bacteriófagos, plasmídeos e/ou transposons (AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

Variações genéticas e presença ou ausência de fatores de virulência podem contribuir para dualidade de comensalismo versus virulência de populações de *E. coli*. Na verdade, várias infecções intestinais e extra-intestinais têm sido vinculadas a clones específicos ou relacionados. A maioria dos isolados de *E. coli* responsáveis por ITU e outras infecções extra-intestinais pertencem ao mesmo grupo filogenético (B2) e em menor medida ao grupo D (ZHANG; FOXMAN; MARRS, 2002).

E. coli uropatogênica (UPEC)

As UPECs são compreendidas como as *E. coli* que desviam seu estado comensal como microbiota do trato intestinal de mamíferos e assumem o seu estado de cepa patogênica, causando doenças extra-intestinais, especialmente ITU. Esta diversidade entre as *E. coli* é devido à presença de determinantes genéticos associados aos fatores de virulência e também relacionados à flexibilidade genética entre estes isolados, além da possibilidade de transferência de genes através de elementos genéticos móveis. Todas estas características podem explicar as diferenças genéticas e a evolução da capacidade de comensalismo, virulência e colonização (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; AGARWAL; SRIVASTAVA; INGH, 2012).

Outra observação relevante, é que as UPECs estão inseridas em um conjunto restrito de clones, com diferentes fatores de virulências (adesinas, fimbrias, toxinas, hemolisinas, sistemas de aquisição de ferro, entre outros). Estes fatores permitem a sobrevivência, colonização e os efeitos citopáticos que exercem no trato urinário. Acredita-se que apesar de um grupo restrito de clones, a difusão de um único grupo de UPEC pode ocorrer dentro de uma comunidade através de alimentos contaminados (MANGES, et al., 2001). Outro aspecto relevante é que, isolados de UPEC de pacientes sexualmente ativos costumam ser isolados em amostras fecais de suas parceiras, indicando que provavelmente as ITUs podem ser adquiridas por transmissão sexual (FOXMAN, 2002).

A UPEC tem a habilidade de colonizar o trato urinário e causar desde uma cistite até uma pielonefrite, podendo evoluir para sepse. Estima-se que 80% dos

episódios de ITU/ano são causados por cepas do tipo UPEC. Nos pacientes hospitalizados de longa permanência, estas cepas podem desenvolver desde pneumonia, bacteremia, até prostatite e normalmente apresentam um perfil maior de resistência que amostras isoladas na comunidade (BÉLANGER et al., 2011).

Infecções do trato urinário (ITU) causadas pela UPEC estão entre as mais comuns infecções bacterianas, com implicações financeiras elevadas devido aos custos diretos onde são incluídas as consultas médicas, ambulatoriais, prescrições de antibióticos e despesas hospitalares, além dos custos indiretos associados à perda de produção (EJRNAES, 2011).

As UPECs isoladas em ITUs, fazem parte de um grupo geneticamente heterogêneo que exibem vários fatores de virulência associados à colonização e persistência das bactérias do trato urinário, além de permitir sua sobrevivência em outros ambientes extra-intestinais, embora, muitos isolados de *E. coli* (UPEC) sejam considerados clonais, não existe descrição de um perfil fenotípico único causando ITU (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005). As estirpes virulentas de UPEC que causam cistite, normalmente produzem pelo menos, um sistema de aderência. Além da adesão bacteriana, vários fatores de virulência podem contribuir para a patogenia da UPEC, facilitando a capacidade de aderir especificamente para células uroepiteliais e a expressão de outros produtos bacterianos aos tecidos, como toxinas, sistemas de aquisição de ferro e mecanismos de evasão de defesa (TIBA; YANO; LEITE, 2008).

Fatores de Virulência (UPEC)

Fatores de virulência (FVs) referem-se ao grau de patogenicidade de um organismo, ou seja, a capacidade relativa de um agente patogênico de provocar doença. São reconhecidos como características específicas que permitem o organismo superar as defesas do hospedeiro e causar doença (EJRNAES, 2011).

As UPECs apresentam maior número de fatores de virulência, quando comparadas com as *E. coli* isoladas de amostras fecais, proporcionando que as cepas de UPEC sejam altamente adaptadas e apresentem facilidade para colonizar e sobreviver na bexiga (MOURA et al., 2009). Em geral, a patogenicidade destes isolados, tem sido relacionada à presença de genes que codificam os fatores de

virulência (FVs), que se organizam em grandes blocos denominados ilhas de patogenicidade. Estes fatores podem ser disseminados de forma horizontal entre cepas de *E. coli*, causando ITUs, meningites e bacteremia (MOURA et al., 2009).

Os fatores de virulência (FVs) associados com UPEC incluem adesinas (fimbria P, fimbria de tipo 1, fimbria S e F1C), toxinas (hemolisina e fator citotóxico necrosante), sideróforos (sistema aerobactin) e revestimentos polissacarídeo (cápsulas II) que permitem a habilidade da bactéria de se ligar e lesar as células e tecidos do hospedeiro em sítios extra-intestinais, estimulando uma resposta inflamatória e subsequente doença extra-intestinal (GUYER et al., 2000). Recentemente, um novo gene de urovirulência, foi relatado, após ter sido encontrado com maior frequência em estipes de UPEC. Este gene codifica uma proteína designada PUE (proteína uropatogênica específica) que conforme demonstrado aumenta significativamente a infecciosidade da *E. coli* em ratos (TIBA; YANO; LEITE, 2008).

A capacidade da *E. coli* (UPEC) em causar infecção do trato urinário na forma sintomática deve-se a expressão dos diversos fatores de virulência, além das hemolisinas (toxinas). A virulência do micro-organismo e os mecanismos de defesa do hospedeiro são considerados fatores determinantes na gravidade da infecção. O grau de gravidade da doença é determinado pelo equilíbrio entre o patógeno e o hospedeiro. Alguns fatores genéticos podem estar associados ao aumento da susceptibilidade nos pacientes assintomáticos ou não (RAGNARSDOTTIR et al., 2008).

Fatores de Aderência (UPEC)

Os fatores de aderência conferem às bactérias a capacidade de aderir ao trato urinário, persistindo e invadindo os tecidos do hospedeiro e causando lesões (RAMA et al., 2005) e com isso estimulando os mecanismos de defesa do hospedeiro e/ou incentivando uma resposta inflamatória (MOURA et al., 2009). As adesinas são consideradas elementos essenciais para a colonização e subsequente infecção do hospedeiro e se localizam preferencialmente nas fimbrias e filamentos da superfície bacteriana. As UPECs podem apresentar vários tipos de adesinas, denominadas fimbria P, fimbria tipo 1 e outras como F1C, S, e Dr (STAMM, 2006).

E. coli associada à meningite neonatal (MNEC)

A NMEC é associada à meningite neonatal, sendo o micro-organismo mais comum entre os Gram negativos (aproximadamente 50%), causando esta infecção. É considerada como a segunda causa de meningite neonatal nos países industrializados, só perdendo em número de casos para o estreptococo do grupo B. A letalidade varia entre 15 a 40%, além de causar sequelas neurológicas em 30 a 50% dos casos (PEIGNE et al., 2009; LOGUE et al., 2012).

A NMEC apresenta vários fatores de virulência adquiridos, que atravessam a barreira hamatoencefálica, em sua maioria polissacarídeo capsular do tipo K1 e fimbrias S. Quanto à classificação filogenética, estes isolados pertencem ao grupo filogenético B2 e apresentam um número limitado de sorogrupos, sendo que 80% das cepas são do tipo capsular K1. Estas cepas utilizam fimbrias S para se ligar a superfície do endotélio do cérebro, além de utilizar outros receptores das células endoteliais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PEIGNE et al., 2009; KATOULI, 2010; LOGUE et al., 2012).

A infecção pode ser adquirida durante o parto ou mesmo por micro-organismos que colonizam o trato respiratório ou intestinal do recém-nascido. Um fator que contribui para gravidade da infecção é a imaturidade do sistema imune. Geralmente estes isolados pertencem ao grupo filogenético B2 (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

E. coli aviária (APEC)

A APEC é considerada um importante patógeno, por causar prejuízos econômicos à indústria aviária, pertence ao grupo das ExPEC e estão associadas a doenças em galinhas (onfalite, peritonite, sinovite, celulite). Apresentam variados fatores de virulência, que incluem fimbrias P, K1, aerobactina e cápsula (MELLATA et al., 2003).

Apesar de diversos estudos realizados, a diversidade, fontes epidemiológicas e origem evolucionária da *E. coli*, do tipo ExPEC são até o momento parcialmente conhecidas. Em Berlim, Ewers e colaboradores, 2007, estudando 526 cepas de origem veterinária e médica, verificaram que os isolados de origem humana em sua

maioria pertenciam ao grupo filogenético B2, seguido de D, enquanto, amostras de origem animal (46%) pertenciam ao grupo A, que não deixam de apresentar um alto potencial para causar infecções no homem. Avaliando genes de resistência, concluíram que a prevalência de genes de invasão e o K1 capsular estavam presentes nos dois tipos de isolados, caracterizando uma estreita relação entre eles. Concluíram que aves podem ser um veículo, ou mesmo um reservatório para isolados de ExPEC no homem, podendo assim, ser reservatório de genes associados à virulência para UPEC e NMEC.

A presença de um clone denominado ST-131, causando infecção urinária apresentando resistência às fluoroquinolonas, levanta a possibilidade de uma fonte externa, que provavelmente pode ser através de alimentos, especialmente frangos, visto que, essa classe de droga tem sido amplamente utilizada como ração para estas aves, conforme descrito em vários estudos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.3 – Infecção do trato urinário (ITU)

Infecção do trato urinário (ITU) é considerada uma das doenças mais comuns em todo mundo. O desenvolvimento da ITU tem sido associado à presença de fatores de virulência entre os uropatógenos, que são responsáveis pela manifestação do quadro clínico específicos destas infecções. Estudos epidemiológicos em distintas áreas geográficas, atribuem este potencial de patogenicidade dos agentes causadores de ITU as subpopulações bacterianas caracterizadas como clones patogênicos, que acredita-se serem responsáveis pela disseminação de resistência, particularmente nas infecções comunitárias.

Nos EUA, a ITU é considerada como responsável por 8,6 milhões de visitas ambulatoriais (84% por mulheres). A infecção é caracterizada pela presença de micro-organismos patogênicos no trato urinário. A carga de morbidade e conseqüentemente financeira associada às infecções urinárias é substancial. Estima-se que ocorram entre 130 e 175 milhões de casos de ITU/ano no mundo, resultando em um custo aproximado de 6.000 milhões de dólares aos sistemas de saúde. Nos EUA as despesas com tratamento de ITU ultrapassam a cifra de 2,47 bilhões de dólares/ano e embora, seja considerada de fácil tratamento, pode causar sérias complicações em

indivíduos saudáveis, contribuindo para uma maior dificuldade no tratamento (KATOULI, 2010; AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

Os agentes etiológicos variam de acordo com a idade, sexo e condições clínicas do paciente. Entre os micro-organismos que causam ITU, a *E. coli* uropatogênica (UPEC) é responsável por 70% a 90% das ITUs adquiridas na comunidade, 80% das bacteriurias assintomáticas, 60% das cistites recorrentes e 50% das nosocomiais. O trato urinário é considerado um sítio comum para o desenvolvimento de infecção de corrente sanguínea, ocasionando nos EUA cerca de 40.000 mortes por sepse/ano (FRIEDMAN et al., 2006; VINCENT et al., 2010).

Outros estudos realizados em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil mostram uma variação de 64 a 90% nas taxas de prevalência de ITU por *E. coli* (ANDRADE et al., 2006; GOBERNADO et al., 2007b; KEAH, 2007; KIFFER et al., 2007; PIRES, 2007; SILVA, 2007).

A ITU pode ser classificada de acordo com o sítio acometido, assim a presença na bexiga é denominada cistite ou infecção baixa, enquanto, a presença de acometimento renal é dita pielonefrite ou infecção alta (FOXMAN, 2002). Em uma revisão realizada nos EUA, com 3200 pacientes com episódio de pielonefrite primário, a incidência anual foi de 12 a 13 casos por 10.000 mulheres (CZAJA et al., 2007).

Outra classificação comumente utilizada refere-se à forma como a ITU apresenta-se quanto a sua sintomatologia, podendo se apresentar de duas formas, sintomática ou assintomática, sendo a do tipo sintomática definida de acordo com a amplitude dos sintomas, podendo variar desde irritação, até bacteremia e sepse. Enquanto, a assintomática é definida como a presença de bactérias na urina em quantidades significativas, com ausência de sinais e sintomas (FOXMAN, 2002).

Em sua maioria as ITUs, são consideradas não complicadas e acometem mais mulheres adultas saudáveis. Enquanto, as ditas complicadas ocorrem associadas a uma condição subjacente que aumenta o risco de falha terapêutica, tais como: obstrução, anormalidade anatômica, disfunção urológica, uso de cateteres, indivíduos imunocomprometidos ou ocasionada por um micro-organismo multirresistente. Esta distinção tem sido utilizada para guiar a escolha e a duração do tratamento antimicrobiano, com espectro mais amplo de agentes e cursos mais longos de

tratamento, muitas vezes recomendado para pessoas com infecções complicadas do trato urinário (FOXMAN, 2002; K. GUPTA et al., 2011; HOOTON, 2012).

1.3.1 – Epidemiologia das ITUs

ITU é considerada a infecção bacteriana mais comum, entretanto, sua incidência não é bem avaliada, por se tratar de uma doença que na maioria das vezes, não é reportada e o diagnóstico preciso depende da associação de sintomatologia com uma cultura positiva. As ITUs afetam milhões de pessoas anualmente nos EUA e em outras partes do mundo e é responsável por um número considerável de prescrições de ATMs entre as infecções adquiridas na comunidade. Devido a alta prevalência, são responsáveis por importantes implicações financeiras, com um custo global estimado de cerca de US\$ 2 bilhões a cada ano (FOXMAN, 2002). No Brasil segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) as ITUs são consideradas as mais comuns das infecções bacterianas, superadas apenas pelas infecções do trato respiratório e são responsáveis por 80/1.000 consultas clínicas/ano.

Mulheres

É descrito que a incidência de ITU em mulheres, pode variar de acordo com a condição sócio-econômica, presença de doença que leva ao imunocomprometimento (ex.diabetes), condições de higiene pós coito, presença de automedicação e alteração anatômica no trato geniturinário.

A incidência anual de ITU em mulheres nos EUA é de 12%, cerca de 1/3 das mulheres são acometidas de pelo menos um episódio de ITU. Já os casos de cistites acometem 0,70 episódios por pessoa/ano entre as mulheres jovens, com possibilidade de recorrência dentro de seis meses em aproximadamente 25% delas, podendo ainda evoluir para pielonefrite numa proporção estimada, de um caso para cada 28 casos de cistites. Em mulheres na fase de pós-menopausa, estima-se ocorrer cerca de 0,07 episódio/ano (FOXMAN et al., 2000; HOOTON, 2012).

A chance de recorrência de ITU nas mulheres que não recebem tratamento adequado é estimada em 44%, dentro de 12 meses. Nestas infecções recorrentes em

aproximadamente 67% é isolada a mesma cepa de *E. coli*, sugerindo existir um reservatório para elas (KATOULI, 2010).

Na Flórida, Czaja e colaboradores (2009) realizando um estudo com mulheres com ITU recorrente, observou que 67% destas infecções são causadas pela mesma cepa de *E. coli*. O estudo concluiu que estas cepas podem estar presentes na microbiota fecal de 78% das mulheres, sem, no entanto, explicar a dinâmica desses clones. Este e outros estudos apoiam a importância da microbiota fecal como o principal reservatório para cepas associadas a ITU.

Mulheres grávidas

A ITU é considerada uma doença benigna nos casos de ITU não obstrutiva, não complicadas ou as que ocorrem nas mulheres grávidas adultas, onde normalmente não leva a consequências médicas. Entretanto, os casos de ITUs de repetição podem ser associados com risco de pielonefrite, parto prematuro, mortalidade fetal, comprometimento da função renal, doença renal terminal entre as crianças, além da necessidade de hospitalização (FOXMAN, 2002).

Homens

Nos homens, a ocorrência de infecção urinária é menor por possuírem a uretra longa, dificultando a contaminação da bexiga por bactérias da região perianal, além da ação bactericida descrita dos fluídos prostáticos (SOARES; NISHI; WAGNER, 2006). Durante os primeiros meses de vida, ocorre maior susceptibilidade do que entre as mulheres, entretanto, a taxa de incidência cumulativa por volta dos seis anos de idade é maior entre as meninas (6,6%), que entre os meninos (1,8%) (MARILD; JODAL, 1998).

Nos EUA é estimado que cerca de 20% das ITUs ocorrem em homens e estima-se que em média ocorram anualmente, cinco a oito casos de cistite por 10.000 homens a cada ano, em sua maioria, resultantes de fatores obstrutivos (malformações, cálculos), diabetes mellitus e rim policístico (FOXMAN, 2002; KUCHERIA et al., 2005; SOARES; NISHI; WAGNER, 2006).

Frequentemente as ITUs que ocorrem nos homens, são consideradas complicadas, uma vez que a maioria ocorre em crianças ou idosos em associação

com anormalidades urológicas, tais como obstrução da bexiga (hiperplasia prostática) ou instrumentação. No entanto, ITUs descomplicadas agudas ocorrem em um pequeno número de homens entre 15 e 50 anos de idade. Fatores de risco associados a estas infecções incluem coito anal e falta de circuncisão (HOOTON; STAMM, 1997).

Crianças

Entre as crianças a ITU é considerada uma das mais comuns doenças bacterianas. Assim, o conhecimento da epidemiologia da infecção urinária é importante na avaliação de uma criança com suspeita de ITU. Nos primeiros seis anos de vida a taxa de incidência cumulativa é alta e estimada em 6,6% entre as meninas e 1,8% entre os meninos. Geralmente o prognóstico é considerado excelente, mas existe possibilidade de complicações, entre elas a cicatriz renal, que pode ocorrer num percentual que varia entre 10 a 40%. Além da cicatriz renal, outro risco reconhecido é a possibilidade de recorrência de ITU num prazo de um ano após o primeiro episódio, variando de 30% para os meninos e 40% para as meninas (BRAUNER; CHROMEK, 2007).

Os recém-nascidos estão entre os que apresentam maior risco de infecções do trato urinário, cerca de 10% dos acometidos nesta faixa etária podem desenvolver bacteremia concomitante (WILLIAMS, 2010).

Entre os lactentes, até 90 dias de idade, as ITUs aparecem como as infecções mais incidentes, sendo que os meninos são mais susceptíveis, que as meninas. Após três meses de idade, as ITUs apresentam maior prevalência em meninas. A prevalência global da infecção urinária é de aproximadamente 7% em lactentes febris e crianças jovens, mas varia de acordo com idade, raça/etnia, sexo e estado de circuncisão (HOBERTMAN et al., 1993; FOXMAN, 2002; KUCHERIA et al., 2005).

Idosos

Pacientes idosos (11% a 25%) não submetidos a cateterismo adquirem ITU assintomática e cerca de 10% desenvolvem ITU bacteriana sintomática. Já os que utilizam cateter urinário, têm maior incidência de ITU, sendo relatado em estudos incidência de 52% em mulheres, mostrando que homens idosos, ao contrário dos homens mais jovens, são tão susceptíveis quanto as mulheres (FOXMAN, 2002; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

A bacteriúria assintomática entre as mulheres na comunidade aumenta com a idade, de cerca de 1% quando jovem, para >20% naquelas acima de 80 anos. Em mulheres diabéticas a prevalência é de 8 a 14%, e, é geralmente correlacionada com a duração e presença de complicações da doença (BENGTSSON et al., 1998; L. E. NICOLLE, 2003).

Entre os homens acima de 75 anos residentes na comunidade a prevalência de bacteriúria assintomática varia de 6 a 15%. Entre os diabéticos, diferentemente das mulheres não ocorre diferença na prevalência (LIPSKY, 1989).

Fatores de risco

Nas ITUs não complicadas, o fator de risco considerado de maior importância, é a relação sexual. A anatomia desempenha um importante papel, o que explica a maior incidência de ITU entre as mulheres. O fato da proximidade do trato geniturinário com o reto propicia a ascensão das bactérias da uretra para a bexiga, podendo ocorrer refluxo da urina da bexiga infectada para ureteres e rim. A rota ascendente do sítio fecal é considerada como o principal meio de transmissão que causa ITU (FOXMAN, 2002).

Na uretra masculina, o ambiente mais seco especialmente após circuncisão, protege o homem do crescimento das bactérias, o mesmo não acontecendo com a uretra feminina. Outro fator protetor é a ação antibacteriana exercida pelas secreções prostáticas nos homens, bem como, a maior distância entre o ânus e a uretra (HOOTON, 2000; MOURA et al., 2009).

Nas mulheres a microbiota genital, exerce um fator de defesa contra as invasões, e em caso de desequilíbrio da ecologia genital (uso de antimicrobiano), pode ser observado um aumento da colonização por uropatógenos e consequente

aumento do risco de infecção (HOOTON, 2000). Outro fator que pode interferir na receptividade das células vaginais são as taxas hormonais, causando maior aderência bacteriana no ciclo menstrual e na pós-menopausa, em comparação com as mulheres pré ou pós-menopausa em reposição de estrógeno, e assim, maior predisposição para ITU recorrente (MOURA et al., 2009).

Outros fatores de risco associados à maior frequência das ITUs são: uso de espermicidas (aumentam o pH vaginal, além de serem tóxicos para os lactobacilos), diafragmas (manipulação na colocação no colo do útero), história prévia de infecção urinária, uso de absorvente, contraceptivos e parceiro novo no último ano (GUIDONI; TOPOROVSKI, 2001; SOARES; NISHI; WAGNER, 2006).

Estudos de caso-controle descrevem não existir associações significativas entre ITU de repetição e padrões miccionais pré-coital ou pós-coito, frequência do consumo diário de líquidos, atraso ao urinar, uso de tampões ou tipo de roupa íntima. Em relação à predisposição genética para ITU recorrente é sugerido que pode ocorrer forte associação entre uma história de ITU em um ou mais parentes de primeiro grau do sexo feminino e um aumento do risco de cistite recorrente e pielonefrite. Entretanto, estes estudos reconhecem a existência de fatores que estão comprovadamente associados ao aumento de risco na aquisição de ITU, e são relacionados a indivíduos com características específicas, incluindo lactentes, grávidas (1 a 4%), idosos, diabéticos, pacientes com esclerose múltipla, lesões espinhal, uso de cateter vesicais, imunodeficiência adquirida e pacientes com anomalias urológicas.

1.3.2 - Patogênese

A patogênese da ITU é considerada complexa, não bem compreendida, podendo ser influenciada por diversos fatores biológicos e comportamentais de acolhimento, e pelas propriedades dos uropatógenos infectantes que apresentam diferentes FVs (adesinas, toxinas, sideróforos, citocinas, hemolisinas, como ilustrados na Figura 1). A presença dos FVs é responsável pela colonização e invasão do sistema imunológico do hospedeiro. O mecanismo de ascensão é incerto, mas

acredita-se que a motilidade mediada por flagelos pode ser considerado um importante fator (EJRNAES, 2011).

As principais vias através das quais os uropatógenos chegam ao trato urinário e causam ITU são: via ascendente e hematogênica, sendo que em sua maioria ocorre pela via ascendente. A colonização da área peri-uretral por agentes patogênicos entéricos é o primeiro passo no desenvolvimento de uma infecção urinária . Esta colonização é considerada um pré-requisito para a infecção da bexiga, podendo estes micro-organismos ascender até atingir o rim e causar pielonefrite (5% dos casos). Provavelmente a motilidade por flagelos e pili tem alguma contribuição para esse mecanismo (WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2005).

Na maioria dos casos de ITU, os clones uropatogênicos são selecionados da microbiota fecal, que colonizam o introito vaginal (como resultado da inoculação direta durante o ato sexual) e o tecido periuretral, alcançando o trato urinário pela via ascendente (TIBA; YANO; LEITE, 2008; HOOTON, 2012). Uma vez no interior do trato urinário, colonizam a bexiga e provocam cistite, podendo também alcançar os rins, através dos ureteres, causando pielonefrite, que pode ocorrer também por propagação de uma bacteremia para os rins (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008; HOOTON, 2012). A presença da UPEC no trato urinário, normalmente estéril, desencadeia reações inflamatórias, levando a produção de citocinas, esfoliação das células epiteliais da bexiga, produção de nitrogênio reativo e outros compostos antimicrobianos (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

A capacidade adaptativa da UPEC levou a desenvolver estratégias para contornar a resposta inflamatória e permitir a colonização e permanência do micro-organismo. Além disso, a facilidade de se ligar ao tecido do hospedeiro é considerada essencial para colonização no trato urinário, a capacidade de suportar o fluxo urinário e alcançar as células uroteliais. Uma vez, presentes nas células epiteliais são transportadas para membrana, alcançam o lumem da bexiga, formando um biofilme intracelular, o que leva o organismo a um processo de esfoliação das células epiteliais da bexiga, tornando a camada subjacente mais susceptível a infecção (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

Diferentes mecanismos de defesa são utilizados pelo hospedeiro para impedir a entrada das bactérias na bexiga, entre eles: fluxo urinário, frequência urinária, pH ácido, osmolaridade e ácidos orgânicos. Outros pontos importantes neste mecanismo de defesa são os fatores de inibição de adesão bacteriana encontrados na própria urina (mucopolissacarídeos, imunoglobulina secretória, proteínas que se ligam a adesinas fimbriais na parede bacteriana, secreções prostáticas), além da própria resposta inflamatória do hospedeiro por polimorfonucleares e citocinas. Todos estes fatores ajudam na eliminação da bactéria.

Embora as cepas de UPECs sejam geneticamente heterogêneas e apesar da identificação e caracterização de diferentes fatores de virulência associados com a colonização e persistência da bactéria no trato urinário, nenhum recurso único pode definir com precisão este micro-organismo, necessitando de uma melhor compreensão dos fatores de virulência e seu trajeto durante um curso de ITU, objetivando melhor entendimento da evolução da doença (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

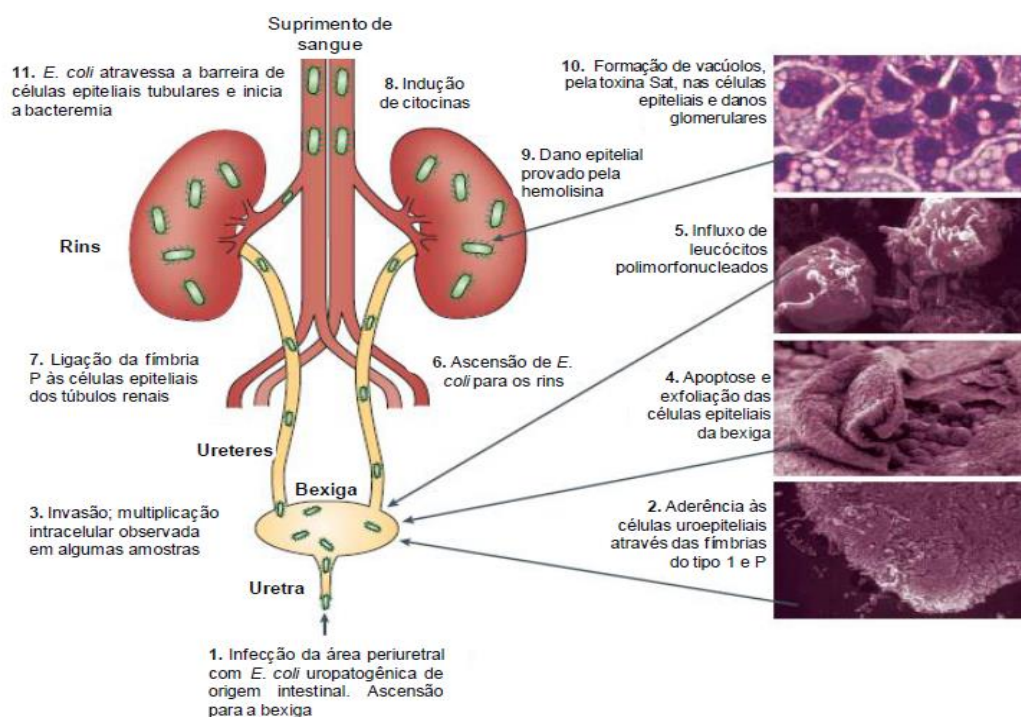


Figura 1. Patogenia da ITU causada por *E. coli* (UPEC) em seus diferentes estágios.

Fonte: www.nature.com/reviews/micro - adaptada por Osugui (2008).

1.3.3 – Aspectos microbiológicos das ITUs

Apesar da *E. coli* responder por 70 a 90% dos isolados, nas cistites e pielonefrites em mulheres, outras enterobactérias, podem ser isoladas nos casos de ITU: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e outras Enterobacteriaceae. Entre as espécies de Gram positivas o *Staphylococcus saprophyticus* aparece como o mais frequente, principalmente associados a episódios de ITU em mulheres jovens, sexualmente ativas. Outras espécies Gram positivas e Gram negativas raramente são isoladas em ITUs descomplicadas. Portanto, padrões locais de susceptibilidade aos ATMs para *E. coli* em particular devem ser considerados na seleção antimicrobiana empírica para ITUs descomplicadas (ECHOLS et al., 1999; KAHLMETER, 2003; HOOTON, 2012).

A cultura de urina é normalmente indicada em pacientes com sintomas de urgência miccional, freqüência ou disúria, em pacientes assintomáticos de alto risco e para seguimento de terapia antimicrobiana. É um exame considerado de grande importância para o diagnóstico das ITUs, pois permite o isolamento do uropatogeno infectante, além da determinação do perfil sensibilidade aos ATMs.

Na maioria dos casos, urocultura é considerada positiva com contagem $\geq 10^5$ UFC/mL, muito embora, 30 a 50% das mulheres com cistite podem apresentar contagem de colônias na urocultura entre 10^2 e 10^4 UFC/mL, sendo necessária nestes casos, a interpretação da cultura com cautela pelos laboratórios, especialmente nas mulheres com sintomas.

A cistite aguda não complicada é considerada uma condição benigna, geralmente com rápida resolução da sintomatologia, em 25 a 42% dos casos. Apenas em raros casos evoluem para forma complicada, ou seja, pielonefrite. Apesar de ser considerada uma condição benigna, a cistite é associada a uma considerável morbidade (HOOTON, 2012).

Nos casos de bacteriúrias sintomáticas, o diagnóstico deve basear-se sobre a cultura de uma amostra de urina coletada de forma que minimize a contaminação. Para mulheres assintomáticas, o diagnóstico deve ser firmado com a coleta de duas amostras de urina consecutivas e isolamento da mesma bactéria em contagens quantitativas de $\geq 10^5$ UFC/mL ou uma amostra de urina coletada por cateterismo com

uma espécie bacteriana isolada em uma contagem quantitativa de $\geq 10^2$ UFC/mL (FOXMAN, 2002).

Adequada manipulação e processamento da amostra são cruciais para evitar resultados falso-positivos. Isolamento de mais de uma espécie ou a presença de *Lactobacillus* ou *Propionibacterium* spp. pode indicar um espécime contaminado (WANKE, 2012).

Isolamento, identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

As amostras de urina foram processadas em um período inferior a duas horas, quando transportadas em temperatura ambiente ou refrigeradas até o momento do processamento. Foi utilizada técnica de semeadura quantitativa (alça calibrada 1/1000) em meios de Agar sangue e Agar Macconkey. Após incubação por 18 a 24 horas as amostras consideradas positivas e suspeitas de ser *E. coli* foram selecionadas para identificação e realização do teste de susceptibilidade aos ATMs pela técnica de microdiluição em placa, utilizando o sistema automatizado WalkAway – Microscan® (Siemens - Califórnia) com painéis NUC 45 para trato urinário, seguindo os critérios de padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), as cepas foram classificadas nas categorias sensível e resistente (FOXMAN et al., 2000; CLSI 2001; OPLUSTIL; ZOCCOLI; TOBOUTI, 2004; CLSI 2009).

Todas as etapas de identificação e teste de sensibilidade aos ATMs foram validadas com a realização do controle de qualidade utilizando a cepa *E. coli* ATCC 25922, seguindo a padronização estabelecida pelo CLSI.

1.3.4 – Resistência bacteriana

Antes de 1990, o problema de resistência aos antibióticos não era considerado uma ameaça para gestão das doenças infecciosas. Entretanto, as falhas de tratamento com utilização de drogas de primeira linha, foram surgindo nas unidades de saúde. Na atualidade a resistência aos ATMs é um crescente problema global no tratamento de doenças infecciosas como malária, tuberculose, doenças diarreicas, infecções do trato urinário, dentre outras; representando um grande desafio para a comunidade médica, no manejo da terapia adequada, além do forte impacto na

morbidade e mortalidade. Inicialmente as infecções bacterianas causadas por micro-organismos resistentes eram restritas ao ambiente hospitalar, onde o uso de ATMs é considerado mais amplo, em função de características próprias do ambiente e dos pacientes, entre elas: falta de aderência às práticas de controle de infecção, hospitalização prolongada, comorbidade dos pacientes, uso de dispositivos invasivos, agrupamento dos pacientes, além da transferência de pacientes colonizados entre os hospitais (BYARUGABA, 2004).

Entretanto, nos últimos anos, tem sido observado um aumento da prevalência de bactérias resistentes na comunidade, a exemplo de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA - AC) associados a pneumonias, infecções de tecidos, entre outros. A possível causa da mudança no perfil de resistência destes isolados pode ser associada a má utilização de antibióticos nos ambulatorios, além do aumento de viagens nacionais e internacionais, onde é possível acontecer transmissão de micro-organismos entre as localidades, visitadas por pacientes oriundos de cidades com micro-organismos com altas taxas de resistência aos ATMs (BYARUGABA, 2004; FURUYA; LOWY, 2006).

Outra possível causa para o desenvolvimento de cepas resistentes aos ATMs na comunidade, foi descrito desde 1950, onde alguns estudos já chamavam a atenção da comunidade científica de que o uso de antibióticos, como promotor de crescimento, adicionados à ração de animais poderia conduzir ao desenvolvimento de cepas resistentes e esses isolados uma vez selecionados, poderiam transmitir resistência para micro-organismos não resistentes e assim, contribuir para o aumento da resistência bacteriana (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

O aumento da resistência aos antibióticos entre os micro-organismos tem sido considerado como um grave problema de saúde pública e é uma das prioridades do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para a prevenção de doenças infecciosas emergentes. Este cenário tem sido apontado como causa da diminuição da eficácia dos tratamentos, prolongamento das doenças e aumento do risco de morbidades mais graves, além, de maior custo de reavaliação e retratamento, maiores taxas de hospitalização e maior uso de antibióticos de amplo espectro e consequentemente aumento da mortalidade (HOOTON et al., 2004; FOXMAN, 2007).

Em suma, a resistência bacteriana é atribuída a uma soma de fatores: aquisição de genes de resistência, pressão seletiva e disseminação clonal. O uso racional de ATMs tanto nos sistemas de saúde, quanto no meio animal e industrial pode ser considerado uma prioridade, já que se avalia que a resistência aos ATMs tem sido atribuída ao uso indevido e não controlado de muitos ATMs e tem se tornado um importante problema mundial (MANIKANDAN et al., 2011).

Apesar de reconhecer que a utilização de ATMs contribua para o surgimento de resistência, através do efeito seletivo, competitivo e da subsequente transferência de resistência, a outras populações bacterianas; a comunidade científica reconhece que a redução da resistência pode ser lenta ou mínima. Estudos apontam para pontos que poderiam contribuir para minimizar a resistência, tais como: a redução do tempo de uso e o ajuste de doses corretas (WRIGHT, 2003; WAGENLEHNER; HOYME; NABER, 2006).

1.3.4.1 – Mecanismos de Resistência aos antimicrobianos

As bactérias utilizam de estratégias para escapar das ações dos ATMs, através dos diversos mecanismos de resistências. A resistência pode ser resultado de uma característica intrínseca do micro-organismo ou adquirida através de alteração do seu DNA, que pode ocorrer de duas formas: indução de mutações no DNA nativo, (evolução vertical) que são eventos espontâneos envolvendo troca na sequência do nucleotídeo cromossomal ou de transferência de material genético extracromossomal (evolução horizontal), podendo ocorrer entre diferentes gêneros e espécies. Estes genes adquiridos podem acarretar resistência aos micro-organismos por diversos mecanismos: a) alteração da permeabilidade da membrana externa, através de proteínas especiais, que estabelecem canais pelos quais as substâncias podem passar para alcançar o interior da célula (porinas), b) alteração do sítio alvo, através de modificações ou criação de novas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina), estas modificações no sítio alvo podem ser mediadas por genes adquiridos e transportados por plasmídeos ou transposons específicos que alteram a ligação do antibiótico, c) bomba de efluxo, onde ocorre bombeamento do antibiótico do meio intracelular para o extracelular, d) mecanismo enzimático, que é considerado o principal mecanismo de

resistência bacteriana, onde a enzima acarreta degradação do antibiótico. Estas enzimas (beta-lactamases) são codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos através de plasmídeos ou transposons, esta resistência pode acontecer de forma constitutiva ou adquirida (ANVISA).

Mecanismos de resistência bacteriana

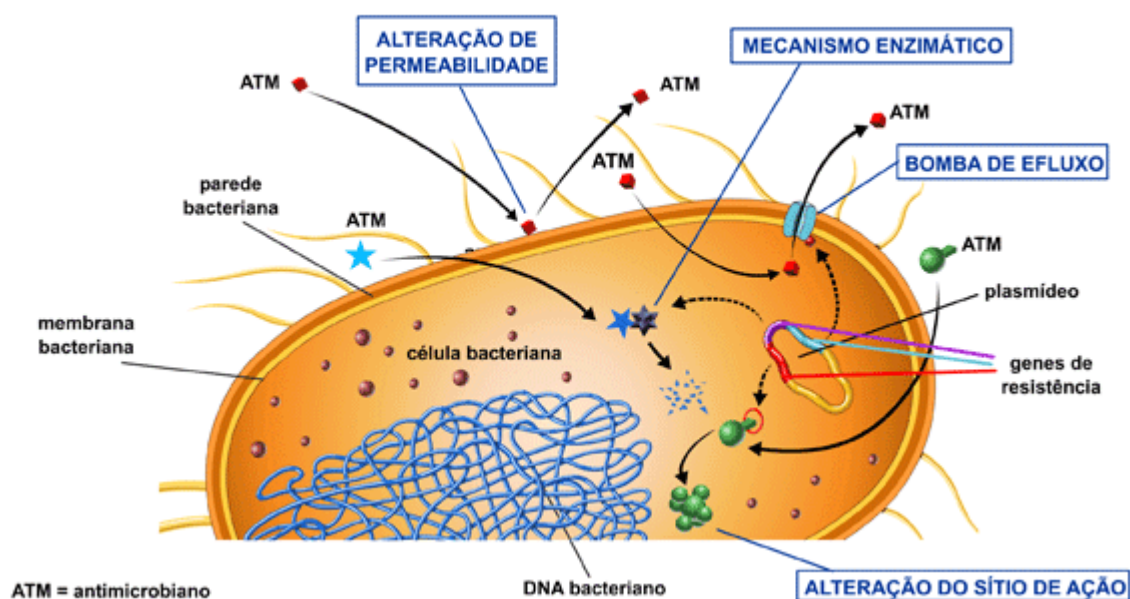


Figura 02. Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

Fonte: www.anvisa.gov.br

Os mecanismos de mutação, seleção e troca genética representam uma ameaça para saúde humana, pois facilitam a adaptação bacteriana ao ambiente e a ocorrência de mutações adicionais que resultam na seleção de micro-organismos resistentes durante a terapia antimicrobiana. A resistência do tipo mutacional é favorecida pelo uso de baixa e intermitente dosagem do antimicrobiano (F. C. TENOVER, 2006; FOXMAN, 2007; MOURA et al., 2009). Estes mecanismos de resistência ocasionam falha terapêutica, podendo ser responsável por consequências graves, especialmente em pacientes críticos (TENOVER, 2006).

Relatos da literatura mundial apontam para o aumento nas últimas décadas do uso inadequado de ATMs na medicina clínica e a consequente disseminação da resistência bacteriana entre os micro-organismos isolados em diferentes infecções bacterianas, incluindo as ITUs. O surgimento da resistência aos ATMs no tratamento

das ITUs tem sido tratado como um grave problema de saúde pública, em particular nos países em desenvolvimento, onde além do baixo nível sócio-econômico, falta de práticas adequadas de higiene, ocorre alta prevalência de medicamentos sem boa procedência (MANIKANDAN et al., 2011).

A resistência entre os isolados de *E. coli* frente aos ATMs cresceu progressivamente, nos últimos anos. Esse aumento tem comprometido o uso de Ampicilina (AMP), Cefalosporinas, SXT e mais recentemente de Fluoroquinolonas. Por isso, a escolha da terapia empírica para o tratamento de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade (ITU-AC) não complicada deve considerar o perfil de susceptibilidade dos uropatógenos isolados na comunidade. A importância da vigilância epidemiológica na escolha da terapêutica empírica é compreendida quando se avalia as taxas de resistências entre os isolados de diferentes países e, até mesmo, de diferentes estados de um mesmo país. Em inúmeros estudos pode-se notar o quanto essas taxas diferem de uma comunidade para outra (K. GUPTA; HOOTON, T. M.; STAMM, W. E., 2001; K. GUPTA, 2002).

O tratamento das ITU-AC envolve um curso de curta duração de um antimicrobiano, tal como SXT que por longa data foi considerado droga de escolha em várias regiões geográficas. Durante a última década, a prevalência de resistência de *E. coli* as drogas antes consideradas de escolha, aumentou, complicando manejo dessas infecções. Uma preocupação mais grave tem sido o aumento gradual da resistência as drogas da classe das fluoroquinolonas (por exemplo, ciprofloxacina) entre os isolados de ITU (A. R. MANGES, ET AL., 2001).

Os estudos de vigilância epidemiológica mostram que existem diferentes taxas de resistência entre as comunidades e até entre os países (GUPTA; HOOTON, T. M.; STAMM, W. E., 2001). Existe também uma considerável variedade geográfica da susceptibilidade *in vitro* de *E. coli*. Em quatro grandes estudos, as taxas de resistência foram maiores nos EUA que no Canadá e superior em Portugal e na Espanha do que outros países europeus (KAHLMETER, 2003; ZHANEL et al., 2006). Em geral, resistência a AMP com taxas de 20% foram relatados em todas as regiões e em muitas regiões o trimetoprim (com ou sem sulfametoxazol). As taxas de resistência à fluoroquinolonas foram 10% na maior parte da Europa e América do Norte, mas havia uma clara tendência para aumentar a resistência ao longo do tempo. Taxas de

resistência para cefalosporinas orais de primeira e segunda geração e amoxicilina/ácido clavulânico regionalmente são variáveis, girando em torno de 10%. Nitrofurantoína, fosfomicina tinham boa atividade *in vitro* em todos os países investigados. Esses padrões sugerem ATMs apropriados para a terapia empírica na maioria das regiões (KAHLMETER, 2003; ZHANEL et al., 2006).

No Brasil, diferentes estados apresentaram variações nas taxas de resistências dos isolados de *E. coli* aos antibióticos de interesse clínico: 11,9% para ciprofloxacina (CIP) e 33,7% para SXT em São Paulo (SP) (KIFFER et al., 2007). No Rio Grande do Sul (RS) 13,0% e 46,1% para CIP e SXT, respectivamente (KOCK et al., 2008) e em Brasília, 9,1% para CIP e 49,4% para SXT (PIRES, 2007).

Resistência aos antibióticos em linhagens de *E. coli* isoladas em humanos, animal e fontes ambientais é uma preocupação de saúde pública. O exemplo das *E. coli* produtoras de ESBL que tem sido responsável pelas principais infecções, seja em nível hospitalar ou de comunidade. Os genes que codificam ESBL são encontrados em plasmídeos que podem carrear genes de resistência para outros antibióticos.

Todos estes dados evidenciam a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela resistência das UPECs aos ATMs, visando aperfeiçoar estratégias de tratamento para as ITUs e controle da propagação de micro-organismos multiresistentes (MOURA et al., 2009).

Resistência de E. coli às fluoroquinolonas

As quinolonas são consideradas bactericidas e agem diretamente no DNA e RNA, inibindo síntese de DNA, diretamente na replicação e transcrição, levando a morte bacteriana. Nas bactérias Gram negativas a DNA girase é o alvo principal, enquanto nas Gram positivas, a topoisomerase IV é mais afetada. O ácido nalidíxico foi à primeira quinolona disponível clinicamente, sendo utilizada apenas para tratamento de Gram negativos. Outras fluoroquinolonas com espectro mais ampliado e melhor penetração em tecidos foram surgindo, e foram sendo indicadas para uma variedade de infecções, inclusive em ITUs complicadas e não complicadas, sendo em muitos casos consideradas agentes de primeira escolha para tratamento de ITU, especialmente em isolados de *E. coli*, aonde a prevalência de resistência a SXT vem aumentando (MOURA et al., 2009).

A resistência a fluoroquinolonas pode ser ocasionada por vários mecanismos entre eles destacamos modificação do alvo da DNA girase e a topoisomerase IV; bomba de efluxo, perda de porinas e aquisição de plasmídeos, mediada por genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*), além de AAC(6') e *qepA*. *E. coli* e outros micro-organismos requerem vários mecanismos mutacionais para desenvolver resistência, embora seja descrito que a resistência as fluoroquinolonas ocorre devido a mutações pontuais em regiões de *gyrA*, *gyrB*, *ParC* e ou *ParE*, que se encontram fixados no cromossomo bacteriano, entretanto, não é bem conhecida a relação entre tipos de mutações e as características demográficas dos isolados (UCHIDA et al., 2010).

As fluoroquinolonas são ATMs considerados de amplo espectro e utilizados com boa eficácia para uma grande variedade de infecções clínicas e veterinárias, além de ser um grupo de ATMs considerado de escolha para tratamento de infecções invasivas gastrointestinais em adultos, em várias regiões do mundo (HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005).

Após a década de 1990, a frequência de isolados de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas, tem aumentado significativamente em todo mundo. A exemplo do Reino Unido, onde a resistência em cepas isoladas de sangue, líquido cefalorraquidiano e urina, no período entre 1991 e 1996 mostrou um aumento de 90% dos isolados com concentração inibitória mínima (CIM) ≥ 2 mg/L. Uma das explicações plausíveis seria o aumento do uso das fluoroquinolonas, já que em 2002, 1381 kg de produto contendo a fluoroquinolona como o ingrediente ativo foi vendido no Reino Unido para uso da medicina humana, medicina veterinária, produção animal e agricultura. Vários estudos clínicos têm associado o uso de fluoroquinolonas, como um importante fator de risco para o surgimento de resistência e falha terapêutica, especialmente no âmbito hospitalar (HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005).

Entre as infecções bacterianas, a ITU é considerada uma das maiores causas de prescrições de antibióticos. Dados publicados em várias regiões, apontam para o uso crescente de fluoroquinolonas em lugar da SXT, como terapia antimicrobiana para o tratamento de ITUs em mulheres em ambulatório, que em sua maioria são acometidas de cistite aguda sem complicações. Conseqüentemente temos assistido um aumento da prevalência de resistência das fluoroquinolonas entre os uropatógenos (COLGAN et al., 2008).

Estudos realizados em diversas partes do mundo relatam um aumento significativo da resistência de *E. coli* uropatogênica a CIP. Na Nigéria, Aboderin e colaboradores (2009) observaram taxas de resistência às fluoroquinolonas (ofloxacina e levofloxacina) extremamente altas (76% e 85%) respectivamente. Outro estudo no Japão revelou uma prevalência de resistência a fluoroquinolona crescente, passando de 46,6% para 59,4%. Já no Senegal, entre o ano de 2004 e 2006 foi registrado um aumento significativo para CIP (15,5%), 23,9% para ácido nalidixico e 23,9% para norfloxacina (ABODERIN et al., 2009).

Contrastando estas taxas, estudos realizados nos EUA e Canadá, mostram que as taxas de resistência a CIP, permanecem em níveis muito confortáveis variando entre 2% a 4%, o que faz da CIP um antimicrobiano recomendado para tratamento das ITUs nestas regiões. As altas taxas de resistência a CIP na Nigéria são atribuídas à pressão seletiva pelo uso livre de antibióticos (ABODERIN et al., 2009).

Na Espanha, Fàbrega e colaboradores (2008) descrevem que o uso de quinolonas em animais tem uma importante participação na aquisição de resistência em bactérias de origem alimentar (tais como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli*) e isso pode levar a uma redução na eficácia de tais ATMs no tratamento de infecções em humanos. Notoriamente, a resistência à quinolonas vem aumentando nos últimos anos e estas bactérias que adquirem resistência, podem transferir este mecanismo a partir de alimentos, para os seres humanos.

Estudos realizados por Drews e colaboradores (2005) indicaram que resistência a quinolona em UPEC é associada com redução da prevalência ou expressão de fatores de virulência quando comparadas com cepas sensíveis a quinolona (DREWS et al., 2005).

No Brasil alguns estudos também enfatizam o crescimento da resistência dos uropatogénos tanto no âmbito hospitalar como comunitário. Um estudo de vigilância realizado em São Paulo envolvendo outros países da América Latina, aponta para taxas de resistência altas para antibióticos de uso comum no tratamento das ITUs, tais como: AMP de 54%, CIP (23%), SXT (40%). Estas taxas foram maiores que taxas encontradas na Europa e EUA. Outro estudo realizado com 32.530 isolados de ITU adquirida na comunidade apresentou taxa de resistência de *E. coli*, para cefalotina (CF) (14%), SXT (34%), já para fluoroquinolona a taxa foi de 12%, sendo que em

pacientes maiores que 60 anos a taxa de resistência foi de 24%, já para AMP 43% e outros ATMs variando 1% a 34% (K.; GUPTA; HOOTON, T. M.; STAMM, W. E, 2001; ANDRADE et al., 2006; KIFFER et al., 2007).

Em nossa comunidade Moreira e colaboradores, 2001, realizando um estudo em dois hospitais, observaram uma taxa de resistência de 12% para CIP, AMP de 20%, SXT (43%). Enfatizando que existe diferença dos perfis de sensibilidade em diferentes áreas geográficas e a necessidade de mais estudos para avaliar a prevalência e perfil de sensibilidade dos uropatógenos aos ATMs.

A resistência dos isolados de ITU as fluoroquinolonas, é de grande preocupação, tendo em vista, que são considerados antibióticos de escolha para tratamento empírico das ITUs complicadas ou não, nas unidades de saúde onde a resistência a SXT é superior a 20%. Este aumento de resistência, não pode ser unicamente relacionado ao aumento do consumo, também pode ser associada a fatores inerentes ao paciente, tais como: anomalias do trato urinário, sondagem e idade, que podem contribuir para o aumento desta resistência (ARSLAN et al., 2005).

O aumento da resistência bacteriana aos ATMs tem sido atribuído a um conjunto de características bacterianas, pressão seletiva pelo uso de antibióticos, mudanças sociais e tecnológicas que contribuem para transmissão e disseminação de micro-organismos resistentes. Assim sendo, prevenção e controle de bactérias multirresistentes, pode exigir a descoberta de novos antibióticos, prudência no uso dos existentes e produção de vacinas (MOURA et al., 2009).

Resistência de E. coli a sulfametoxazol/trimetoprim (SXT)

Diversas diretrizes no mundo, incluindo a da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (SADI), recomendam SXT como droga de primeira linha para tratamento das cistites agudas, entretanto, devido ao aumento progressivo da resistência, existe uma grande preocupação sobre seu papel como droga empírica para o tratamento de ITU (HOOTON et al., 2004). Este fato desencorajou a comunidade médica a considerar esta droga para tratamento empírico, em mulheres sem fatores de risco subjacentes, tais como, idade e diabetes (GUPTA, K.; HOOTON, T. M.; STAMM, W. E, 2001).

O declínio da utilização de SXT tem sido ocasionado pelas taxas crescentes de resistência apresentadas entre as UPECs. A grande preocupação entre estes dados apresentados é a possibilidade de parte destas amostras, pertencerem a amostras hospitalares, baseadas apenas em laboratórios de microbiologia e assim, podem não refletir com precisão a prevalência de resistência a SXT, entre as mulheres saudáveis procedentes dos ambulatórios, além de que, em alguns casos não são realizadas culturas e nem perfil de susceptibilidade. Assim, estas taxas podem ter seus resultados desconhecidos ou superestimados (COLGAN et al., 2008).

As taxas de resistência a SXT para *E. coli* isoladas das ITUs apresentam uma variação entre as diversas regiões geográficas locais, entre os países desenvolvidos variam de 20 a 40%. Enquanto, na América do Norte as faixas de resistência variam entre 18 a 25%, e acredita-se que tenha uma relação com a propagação clonal. Em relação aos países em desenvolvimento, especialmente os da África, as taxas variam entre 67 a 85%. Estas altas taxas estão associadas ao uso extensivo e fácil disponibilidade de ATMs e são considerados fatores que contribuem para os relatórios de tendências de resistência aos ATMs em isolados de *E. coli* uropatogênica. Outra hipótese é que as *E. coli* resistentes encontradas em humanos são provavelmente transmitidas a partir de animais, por exemplo, uso de antimicrobiano em criatórios de aves e não foram originadas a partir da conversão de cepas sensíveis em cepas resistentes em humanos, pós uso de ATMs (WARREN et al., 1999; ABODERIN et al., 2009).

Dados de perfis de susceptibilidade aos ATMs para tratamento de ITU por *E. coli*, indicam que os mecanismos de rotina devem ser estabelecidos em pacientes com ITU adquirida na comunidade, para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de uropatógenos e que o regime padrão para a terapia empírica deve ser reavaliado periodicamente em função da evolução dos padrões da resistência bacteriana (WARREN et al., 1999).

Resistência de E. coli aos β -lactâmicos

Os antibióticos da classe β -lactâmicos constitui a maior classe de ATMs utilizados para tratamento das infecções bacterianas. A resistência a esta classe de ATMs é considerada uma grande preocupação na comunidade científica, por ser

reconhecido como o mecanismo mais comum de resistência a drogas, em especial entre os Gram negativos. Três mecanismos principais de resistência são descritos entre os β -lactâmicos: diminuição de ligação com o sítio alvo (PBPs- proteínas ligadoras de penicilina), produção de enzimas que degradam o antibiótico (penicilinases, cefalosporinas e β -lactamases) e alteração da permeabilidade da membrana (porinas) (WANKE, 2012).

A resistência a cefalosporinas é mediada por plasmídeo, sendo as principais enzimas envolvidas: TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 que hidrolizam β -lactâmicos, entre eles as cefalosporinas. Algumas cepas sofrem mutações e aumentam seu espectro de resistência, tornando-se produtora de ESBL (TENOVER, 2006).

A ocorrência crescente das β -lactamases, transmitidas por plasmídeos entre as enterobactérias, conferindo resistências as cefalosporinas é considerado uma preocupação mundial. Entre as β -lactamases descritas, as mais prevalentes e conhecidas são as da Classe A de Amber ESBLs, especialmente as TEM, SHV e CTX-M, sendo que a do tipo CTX-M ocorre mais frequentemente, em especial na Europa, EUA, além de outras áreas do mundo. O segundo tipo de β -lactamase é a do tipo AmpC, classificada como Classe C de Amber, podendo se apresentar com resistência do tipo plasmidial e cromossomal. Entre as AmpCs a CMY-2 é considerada como mais frequente nas diversas áreas geográficas, hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e monobactamas e não são inibidas pelo ácido clavulânico (DALLENE et al., 2010; VOETS et al., 2012).

Outras enzimas β -lactamases de grande importância e com constante aumento, são as carbapenemases do tipo: metalo-beta-lactamases (MBLs), KPC e as do tipo OXA, muito encontrada em bactérias Gram negativas do tipo não fermentadores, tais como: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. (DALLENE et al., 2010).

A resistência aos β -lactâmicos em *E. coli* até a década de 90 estava envolvidas basicamente dois tipos de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs) as do tipo TEM e SHV, consideradas ceftazidimases, codificadas por plasmídeos. As enzimas do tipo CTX-M, foram descritas na África do Sul, nos meados de 90, adquiridas por transferência de elementos genéticos móveis de bactérias ambientais. Estas enzimas são da classe das cefotaximases e apresentam maior

atividade hidrolítica para cefotaxima de que as SHV e TEM. As CTX-M são consideradas prevalentes entre as β -lactamases em diversos países, inclusive Brasil, especialmente a variante CTX-M-15 e tem sido envolvida na resistência de *E. coli* a β -lactâmicos em infecção do trato urinário, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade (NARCISO; et al., 2010).

As enterobactérias, em especial *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., estão entre os micro-organismos mais isolados nas ITUs, infecções de corrente sanguínea, pneumonias, infecções intra-abdominais, entre outras. Nesse grupo de bactérias a resistência aos β -lactâmicos, em geral é estendida a outras classes de antibióticos, a despeito das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos e os membros desta família evoluíram para se tornar cada vez mais resistentes aos ATMs disponíveis, sendo considerado um importante problema mundial. Este evento exige a intensificação de medidas para controle da disseminação destes micro-organismos, principalmente pela melhoria na administração de antibióticos e estratégias para controle das infecções (PATERSON, 2006; NARCISO; et al., 2010).

Embora sejam descrito numerosos mecanismos de resistência entre as bactérias, à epidemiologia molecular desses mecanismos é em grande parte desconhecida, pois os grandes inquéritos em sua maioria são limitados a determinadas espécies (*E. coli*, *K. pneumoniae*), determinadas amostras (sangue, urina) ou em ambiente específico (hospitalar ou comunitário) (DALLENNE et al., 2010).

1.3.4.2 – Disseminação da resistência bacteriana

O problema da multi-resistência entre as bactérias é considerado como uma das ameaças futuras, mais significativas para a resistência aos antibióticos utilizados como tratamento nas unidades de saúde pública no mundo.

Uma bactéria que se torna resistente a antibióticos, pode, em seguida, transferir esta resistência para as bactérias que causam doenças em humanos, mesmo entre espécies diferentes. A maior proporção de transferência de genes entre as bactérias é realizada com o auxílio de elementos genéticos móveis conhecidos como plasmídeos conjugativos, uma parte do DNA bacteriano. Um plasmídeo

carreando gene de resistência pode ser transferido para outra célula e dessa forma se disseminar entre outras bactérias (SAURINA et al., 2000; OKEKE; EDELMAN, 2001).

Embora os micro-organismos multirresistentes envolvidos nas infecções adquiridas no ambiente hospitalar e na comunidade sejam em muitos casos diferentes, muito pode ser feito através da notificação epidemiológica das infecções nosocomiais causadas pelas bactérias multirresistentes, especialmente para se evitar a propagação destes micro-organismos entre as diferentes instituições de saúde. Alguns fatores que contribuem para as infecções nosocomiais são: deficiência dos laboratórios de microbiologia, portadores assintomáticos, reservatórios ambientais, transferência inter e intra-hospitalar de pessoas colonizadas, inadequado controle de infecções e a não aderência a lavagens das mãos pelos profissionais (SAURINA et al., 2000; OKEKE; EDELMAN, 2001).

Assim como ocorre entre as diferentes unidades de saúde, a pressão de seleção de bactérias multirresistentes difere entre as áreas geográficas. As comunidades que apresentam maior prevalência de resistência, geralmente costumam apresentar probabilidade para o risco de aquisição de resistência semelhante ao ambiente hospitalar. Estas características incluem: uso indiscriminado ou excessivo de ATMs, alta densidade populacional, inadequada fiscalização do meio ambiente como reservatório e deficiente controle das infecções (OKEKE; EDELMAN, 2001).

Além do uso indiscriminado, a automedicação, também é considerada como importante fator responsável pelo aumento progressivo das taxas de resistência antimicrobiana nos uropatógenos. Apesar de muitos estudos reconhecerem a importância desses fatores no aumento das taxas de resistência nos hospitais, as causas do aumento de resistência bacteriana na comunidade não são tão aparentes, sendo necessário o esclarecimento da contribuição de outros fatores que poderiam estar relacionados ao aumento e disseminação de micro-organismos resistentes nesta situação (FOXMAN et al., 2000; NICOLLE, L. et al., 2006).

A magnitude do problema é relatada pela Organização Mundial de Saúde (OMS): “A resistência antimicrobiana é um problema global que afeta países desenvolvidos e em desenvolvimento e que se espalha rapidamente entre continentes, através das viagens internacionais” (OKEKE; EDELMAN, 2001).

1.3.4.3 – Pressão seletiva dos antimicrobianos

A existência dos micro-organismos na terra data de mais de 3,8 bilhões de anos e apresentam a maior diversidade genética e metabólica. Os micro-organismos desenvolvem mecanismos de resistência que os habilitam a responder às pressões exercidas pelo ambiente e garantir sua sobrevivência. Estes mecanismos de resistência desenvolvidos pelos micro-organismos têm sido considerados uma ameaça global a gestão das unidades de saúde (BYARUGABA, 2004).

Logo após a descoberta do primeiro antibiótico e sua utilização de forma ampla (1940), teve início a resistência bacteriana e a percepção da possibilidade de falha terapêutica devido à pressão seletiva exercida pelos antibióticos. Assim, ao longo dos anos tem sido observado um aumento da prevalência de resistência em diferentes áreas geográficas do mundo, incluindo os países desenvolvidos. Esta tendência tem sido atribuída às características microbianas, pressão seletiva dos ATMs e mudanças sociais e tecnológicas que se acredita serem responsáveis pela transmissão de micro-organismos resistentes aos ATMs (BYARUGABA, 2004).

A pressão seletiva ocorre como resultado do impacto da utilização dos ATMs em uma determinada população de micro-organismos, onde os micro-organismos resistentes ao antimicrobiano exercem uma vantagem sobre os sensíveis e sobrevivem. Esta população de resistentes é selecionada e passam a sobrepor a população comensal, podendo passar a ser reservatório e ocasionar uma infecção futura (FURUYA; LOWY, 2006).

Segundo Hotoon e colaboradores (2004) a pressão seletiva exercida pelos ATMs nos ambientes, tais como: asilos, hospitais e outros ambientes fechados, contribui para seleção e disseminação de clones resistentes, aumentando o nível de resistência dos micro-organismos, o que pode representar um sério risco no tratamento das infecções bacterianas.

Moura e colaboradores (2009) realizando estudo sobre antibioticoterapia em ITU não complicada em Portugal, sugerem que várias combinações de características microbianas, pressão seletiva pelo uso de ATMs, mudanças sociais e tecnológicas, tem contribuído para o aumento da resistência bacteriana nas ITUs, ocasionando uma mudança acentuada no tratamento destas infecções.

Todos estes fatores levam a uma diminuição da eficácia de agentes ATMs disponíveis, tornando mais difícil de controlar e tratar as infecções. Há conseqüentemente interferência no controle da disseminação destes micro-organismos, contribuindo assim para elevação da morbidade e mortalidade de doenças infecciosas anteriormente tratáveis, como a tuberculose, a malária, doenças respiratórias agudas e diarreia (BYARUGABA, 2004).

Acredita-se que a resistência bacteriana aos ATMs é causada pelo mecanismo de pressão seletiva dos ATMs, ocasionado pela administração de antibióticos, sendo desta forma previsível, porém inevitável (WRIGHT, 2003).

Uso de antibióticos em humanos

O uso humano de antibióticos pode ser categorizado de duas formas: uso hospitalar e uso na comunidade. Considera-se que o uso hospitalar ocorre de forma ampla, contínua, em pacientes mais susceptíveis a procedimentos invasivos em uma população em ambientes restritos como enfermarias e unidades de tratamento críticos (UTIs). O uso na comunidade é considerado descontínuo, em população de menor número, em locais independentes e em área dispersa.

No ambiente hospitalar o uso pouco criterioso e indiscriminado favorece a seleção de micro-organismos resistentes e a pressão seletiva nestes ambientes é considerada efetiva e tem como consequência o aumento da prevalência de resistência, secundária a seleção dos micro-organismos (ANVISA; SANTOS, 2004; SOTO, 2009) Já na comunidade, é provável que o aumento das taxas de resistência seja secundário a pressão seletiva existente, resultante do uso amplo na população, sem que seja possível mensurar, especialmente nos países em desenvolvimento, devido à prática de uso inadequado e em subdoses (KUNIN; LIU, 2002).

Estudos realizados em diferentes áreas geográficas que tentam comprovar a existência de uma correlação entre consumo de antibióticos e aumento das taxas de resistência, são discordantes, quanto à evidência de uma associação positiva (BARTOLONI et al., 2004; COLGAN et al., 2008).

Avaliando a relação entre consumo de antibióticos e aumento de resistência bacteriana, os estudos realizados em pacientes hospitalizados e da comunidade apresentam dados favoráveis e contraditórios. Estudo realizado nos EUA descreve

que o uso amplo de CIP estava associado à maior resistência entre as enterobactérias isoladas em pacientes em ambiente hospitalar. Já no Reino Unido, Livermore e colaboradores (2002) estudando tendência de resistência a CIP em pacientes com infecção de corrente sanguínea, não encontrou diminuição da resistência de *E. coli* às fluoroquinolonas, apesar da diminuição de prescrição, o mesmo acontecendo com a diminuição de sulfametoxazol/trimetoprim (ENNE et al., 2001; MUTNICK et al., 2004). Porém, outros estudos mostraram uma associação entre o uso ambulatorial das fluoroquinolonas e a resistência a essas drogas (GOETTSCHE et al., 2000; MACDOUGALL et al., 2005).

No Brasil poucos estudos são realizados neste âmbito. Em 2010, Jacoby e colaboradores avaliando aumento de produção de beta-lactamases do tipo ESBL (beta-lactamase de espectro estendido) e *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), apresentaram dados que mostravam que o aumento do uso de cefalosporinas e fluoroquinolonas, além de procedimentos invasivos, poderia ter uma relação direta com o surgimento de *S.aureus* MRSA e enterobactérias produtoras de ESBL.

Uso de antibióticos na agricultura e veterinária

As zoonoses que ocorrem principalmente em países industrializados, ou seja, doenças infecciosas transmitidas de animais vertebrados para o homem são de origem alimentar causadas por bactérias presentes no trato gastrointestinal de animais destinados à alimentação. Os principais gêneros envolvidos são *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Listeria* spp. e *E. coli*, especialmente *E. coli* do grupo enterohemorrágicas.

A maioria das infecções de origem alimentar é procedente da contaminação fecal durante as várias etapas do processo de abate (por exemplo, evisceração) e tratamento subsequente de tecido animal (AARESTRUP; WEGENES, 1999).

O uso de ATMs de forma desorganizada na produção de alimentos de origem animal, profilaxia e como promotores de crescimento, ocasiona uma seleção de bactérias resistentes que podem ser transferidas para seres humanos através de alimentos ou pelo contato direto com animais. Este uso tem sido amplo, especialmente em países em desenvolvimento e muito pouco tem sido investido para

conter o problema do surgimento da resistência bacteriana, considerado um problema global e que certamente exige esforços entre as nações para estabelecer um programa educacional para o uso responsável dos agentes ATMs disponíveis, seja em humanos ou na agroveterinária (SCHROEDER et al., 2002; BYARUGABA, 2004).

O quanto à utilização de ATMs em animais pode contribuir no aumento da resistência bacteriana, ainda é muito discutido, embora se reconheça que os alimentos de origem animal podem servir de fonte para infecções alimentares bacterianas (SCHROEDER et al., 2002).

Não só nos criatórios de animais, como também na indústria, agricultura, o uso de antibióticos é bem difundido. Nestes meios os antibióticos são pulverizados para eliminar bactérias de superfície e na indústria, por exemplo, os antibióticos são aplicados para evitar crescimento bacteriano, principalmente no interior de locais para armazenamento de óleo. O uso é em subdoses e por tempo prolongado (semanas a meses) para fins não terapêuticos, e são usados os mesmos antibióticos de categorias similares aos que são utilizados em seres humanos. Acoplado as situações descritas, ainda existe a não regulamentação do uso. Todo este cenário se mostra perfeito para seleção de bactérias resistentes e disseminação tanto em animais, como em seres humanos (FURUYA; LOWY, 2006; SONDERHOLM, 2008).

Em 1999 Collignon, descreveu existir um amplo consenso científico sobre o uso de antibióticos em alimento animal e os efeitos nocivos à saúde do homem. Podemos citar o exemplo da avoparcina utilizado como promotor de crescimento, levando a um aumento da resistência de enterococos à vancomicina (VRE) que carrega o gene VanA e pode levar a colonização da população por esta bactéria, conforme descrito em estudos na Europa. O grupo de Collignon, realizando estudos na Holanda em carne de frango, observou que 70% da carne vendida no varejo, continuava colonizada por VRE mesmo após o abate. A presença de VRE em hospitais e na comunidade é motivo de grande preocupação na medicina, pois a vancomicina é considerado um antibiótico de “última linha” para algumas infecções hospitalares e este tipo de resistência também oferece um grande risco de transferência dos genes de resistência a vancomicina para *Staphylococcus aureus* (MRSA) (OKEKE; EDELMAN, 2001).

Em relação aos *S. aureus* com resistência a metilina (MRSA), é descrito um número crescente de derivados de animais, especialmente carne de suínos com MRSA, causando infecções humanas na comunidade. Estudos realizados na Holanda em criatórios de porcos e avaliando colonização em narinas, além de infecções entre humanos que lidavam com estes animais, apontam a presença de clones comuns associados à colonização dos animais e humanos, além de infecções. O *S.aureus* também pode causar infecções em outros animais, incluindo aves e bovinos.

Nos EUA, Europa e outras partes do mundo, a resistência a CIP para *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli*, está associada ao uso de enrofloxacin, antibiótico semelhante à CIP. Em países onde fluoroquinolonas são ou foram frequentemente usadas em animais de produção (ex. Espanha, China e EUA), as taxas mais elevadas de resistência são observados entre os isolados em alimentos derivados de animais e em seres humanos. Nestes últimos países, os níveis de resistência aumentaram muito rapidamente, coincidindo com a introdução do uso de fluoroquinolonas em animais destinados à alimentação (SONDERHOLM, 2008; COLLIGNON et al., 2009). Na Austrália existe uma proibição para este uso e com isso, as taxas de resistência de *E. coli* giram em torno de 4%, mesmo em isolados de infecções nosocomiais, enquanto, nos EUA as taxas são registradas na faixa de 30% e na China 60% (SONDERHOLM, 2008).

O uso amplo de cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações em aves também é relatado nos EUA. Aproximadamente 25% dos oito bilhões/ano de frangos destinados a produção de carne, é injetada com ceftiofur (antibiótico de uso veterinário, correspondente a uma cefalosporina de terceira geração), elevando a resistência às cefalosporinas e conseqüentemente ocasionando o aparecimento de *E. coli* produtora de ESBL, predominantemente na comunidade, com ou sem contato com cefalosporinas (COLLIGNON, 2009).

Publicação do ano de 2001 relata que a produção anual global de antibióticos nos EUA é de 17,5 milhões de quilos. Destes, 12,5 milhões de quilos são utilizados para fins não terapêuticos na produção pecuária e 1,5 milhões de quilos são utilizados para a terapia médica humana. Já a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano 1998 aponta que as quinolonas são liberadas para uso em animais de produção na

Ásia, América do Sul e África e estima-se que na China o consumo em animais, chegue a 470 toneladas/ano (MELLON; BENBROOK; BENBROOK, 2001).

Desde a década de 90 que o uso de antibióticos em animais, seja para tratamento ou como promotor de crescimento, tem chamado a atenção dos cientistas e estudos foram realizados na Holanda e Reino Unido, mostrando que o consumo de antibióticos em animais apenas com a finalidade de promover crescimento era quatro vezes mais que em adultos humanos, chegando a uma estimativa de 300.000 Kg/ano para animais contra 80.000kg/ano em humanos. Na Dinamarca, estima-se que cerca de 35 toneladas/ano de antibióticos são utilizadas para terapia humana, 53 toneladas/ano são utilizadas em animais na terapia e profilaxia e 107 toneladas para promoção de crescimento (AARESTRUP; WEGENES, 1999). Estes dados mostram que a pressão seletiva exercida pelo uso veterinário de antibiótico sobre a microbiota bacteriana nos animais é da mesma ordem de magnitude que a exercida pelo uso humano sobre sua microbiota bacteriana. Essa pressão seletiva tem aumentado amplamente, devido à ampla exposição dos animais aos antibióticos como agentes promotores de crescimento. No entanto, existe uma relativa escassez de dados sobre a extensão da resistência antimicrobiana entre *E. coli* de origem alimentar (SCHROEDER et al., 2002).

A prevalência da resistência antimicrobiana em bactérias comensais de humanos e animais é usada como um indicador da pressão seletiva pelo uso de ATMs (MURRAY, 1992). É descrito que, os antibióticos fazem parte dos resíduos de produtos alimentares e permitem a seleção de bactérias resistentes após o consumo do alimento, sendo liberado no meio ambiente por animal e efluentes humanos. Estas bactérias resistentes dos animais podem causar infecção no homem pelo contato direto ou através de alimentos de origem animal, podem também colonizar os seres humanos ou transferir sua resistência para outras bactérias da microbiota humana, através de genes de resistência (ANNA F`ABREGA et al., 2008).

No Reino Unido, Woodford e colaboradores (2007) realizaram estudos buscando uma possível ligação entre o aumento de *E. coli* produtoras de ESBL e produção de alimento animal. Foi sugerido que a possível fonte seria frango importado, embora, não tenha sido possível identificar uma relação direta entre *E. coli* ESBL positiva, frango e humanos. Entretanto, em Minnesota, outros investigadores

encontraram evidências para uma ligação entre a resistência às drogas e genótipos de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) em animais, produtos alimentares e infecções humanas (MANGES, et al., 2001).

Em outro estudo realizado no Canadá, Vicent e colaboradores (2010), analisando isolados de *E. coli* de amostras clínicas humanas, restaurantes e carne vendida a varejo, obtidas no mesmo período, identificaram isolados de frango e outros alimentos, que apresentavam perfis genéticos indistinguíveis ou relacionados aos isolados de ITU. Os autores levantam a hipótese de que, a presença dessas cepas causando surtos sugere que fontes ambientais, carne e outros alimentos, podem contribuir para disseminação de cepas de *E. coli* intimamente relacionadas. Se produtos alimentares de origem animal servem como reservatórios para ExPEC, provavelmente o uso de ATMs na produção desses alimentos pode levar a seleção de ExPEC com resistência aos ATMs (MANGES, et al., 2001).

O uso de antibióticos e produtos similares utilizados como promotores de crescimento e tratamento em animais de abate tornou-se uma característica da pecuária moderna, e ao mesmo tempo, uma preocupação pela possibilidade de seleção e disseminação de cepas resistentes. Embora muitos produtos utilizados como promotores do crescimento tenham pouca ou nenhuma aplicação na medicina humana, os utilizados na profilaxia e terapia são, muitas vezes, intimamente relacionados aos antibióticos utilizados na prática clínica: β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas); sulfonamidas associadas ou não ao trimetopim; tetraciclina; macrolídeos; lincosaminas e quinolonas (incluindo fluoroquinolonas). Portanto, essa prática pode exercer uma pressão seletiva importante na comunidade (I. PHILLIPS et al., 2004).

É bem descrito que o uso de ATMs é o fator mais importante na seleção da resistência em bactérias, e este fato, leva a crer que existe uma relação estreita entre a taxa de desenvolvimento de resistência e as quantidades de agentes ATMs utilizados quer seja no ser humano ou em animais e este desenvolvimento de resistência em bactérias zoonóticas constitui um risco para a saúde pública, especialmente no que diz respeito ao aumento do risco de falhas no tratamento (AARESTRUP; WEGENES, 1999).

A emergência da resistência aos antibióticos na medicina veterinária e no setor agrícola apresenta padrões semelhantes aos dos humanos. Utilizam-se grandes quantidades de medicamentos anti-infecciosos não só para tratar animais doentes, mas também como suplementos regulares para prevenir infecções. Na União Europeia como líder mundial neste contexto, existe atualmente uma legislação que impede o uso de antibióticos utilizados nos humanos como promotores de crescimento nos alimentos para animais.

Existe um consenso científico de que o uso de antibióticos nos alimentos para animais, em algumas ocasiões, tem efeitos nocivos na saúde humana, aonde quer que os antibióticos sejam usados, as mais importantes consequências são o desenvolvimento e propagação de bactérias resistentes, seja em pessoas ou animais. Se animais carregam bactérias resistentes, alimentos produzidos a partir destes animais, vão conter estas bactérias. Após ingestão dos alimentos, as pessoas podem se colonizar ou se infectar com estas bactérias (SONDERHOLM, 2008).

Uma forte evidência do aparecimento de cepas de *E. coli* resistentes aos ATMs entre humanos e alimentos derivados de animais, especialmente aves, seria o aumento desproporcional do consumo pelo homem de frango a retalho, observado nos últimos 30 anos, e que provavelmente acarretou mudanças na metodologia de produção, incluindo o aumento do uso de ATMs como promotor de crescimento, prevenção e tratamento de infecções. Todas essas mudanças poderiam ter influenciado na seleção de *E. coli* multirresistente, que a partir de alimentos para animais, ou de produtos à base de carnes destinada a alimento humano, poderiam colonizar o intestino do consumidor e em determinadas circunstâncias causar infecção extra intestinal, como por exemplo, ITU (MANGES; JOHNSON, 2012).

Diante de todas as evidências nos diversos estudos revisados, os autores ressaltam a importância de se identificar as fontes ou reservatórios potenciais de ExPEC associados às infecções humanas, como forma de reduzir a transmissão ou pelo menos, reduzir a disseminação de resistência (MANGES; JOHNSON, 2012).

1.3.5. – Epidemiologia Molecular

Epidemiologia molecular é definida como o estudo das doenças como ocorre nas populações humanas, tendo como objetivo avaliar as doenças em relação às características genéticas do micro-organismo causador da doença, através do uso de observações planejadas para identificar características microbianas, a fim de prever a ocorrência, gravidade, ou manifestações clínicas das infecções, ou ainda, particularidades importantes do hospedeiro, tais como, idade, sexo e fatores predisponentes. Os estudos epidemiológicos moleculares tem como objetivo conhecer as bases moleculares para estudar virulência, ocorrência, gravidade, relação do hospedeiro com os patógenos, como também identificar patógenos e vias de transmissão visando um maior entendimento da dinâmica e prevenção das infecções (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Entre os aspectos analisados nos micro-organismos na epidemiologia molecular, estão sequência de DNA, genes, operons, plasmídeos e ilhas de patogenicidade, clones, grupos clonais e grupos filogenéticos. Entre os métodos utilizados, a técnica mais discriminatória e com maior reprodutibilidade, que pode ser utilizada na tipagem de diversas espécies bacterianas, é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), no qual o DNA bacteriano total é eletroforeticamente separado após digestão com uma endonuclease de restrição que reconhece um número limitado de sítios genômicos. A partir das bandas geradas no gel de eletroforese é feita uma análise comparativa entre os fragmentos buscando a identificação de clones (JOHNSON; RUSSO, 2005).

A análise genotípica dos patógenos é considerada de grande importância nas investigações epidemiológicas dos agentes de doenças infecciosas. A genotipagem destes isolados são passíveis de validação em doenças que ocorrem em forma de surtos, como as causadas por *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7. O empasse ocorre quando se trata de caracterizar micro-organismos associados às doenças que não são reconhecidamente causadoras de surtos, como no caso das ITUs por *E. coli*. Entretanto, estudos recentes pesquisando UPEC, sugerem que ITUs adquiridas na comunidade poderiam ocorrer em forma de surtos (TARTOF et al., 2005).

1.3.5.1 - Teste genotípico para avaliação de clonalidade

As técnicas moleculares são aplicadas à epidemiologia, objetivando a estratificação e refinamento dos dados de forma confiável, facilitando as investigações epidemiológicas (FOXMAN; RILEY, 2001).

A capacidade de identificar um micro-organismo no nível de espécie e de discriminar entre indivíduos da mesma espécie é realizada através da tipagem destes micro-organismos, com métodos que tem somado grandes avanços nos últimos anos. Estas metodologias utilizadas parte da proposição de que os isolados relacionados epidemiologicamente são oriundos da expansão clonal de um antecedente único e, que apresentam características que diferem dos isolados considerados não relacionados. Com o desenvolvimento destas técnicas tornou-se possível o conhecimento de importantes informações a serem utilizadas na vigilância epidemiológica e controle das doenças infecciosas (MASLOW; MULLIGAN; ARBEIT, 1993).

A escolha da metodologia genotípica adequada para ser utilizada na tipagem dos micro-organismos, deve se basear na sua tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, estabilidade e concordância epidemiológica, bem como a possibilidade da adequação da técnica para a espécie a ser estudada. Outras considerações que devem ser avaliadas são: acessibilidade, flexibilidade, rapidez, custos, adequação dos resultados para informatização e qualificação profissional (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; VAN BELKUM et al., 2007).

Entre as técnicas padronizadas para tipagem de micro-organismos, o PFGE é considerado uma técnica de fácil execução e rapidez, apesar da baixa reprodutibilidade que apresenta entre as corridas e entre os laboratórios, além de apresentar certa dificuldade no momento da interpretação dos padrões de ampliação e dos critérios para definição dos clones (VAN BELKUM et al., 2007).

Eletroforese em gel de campo pulsado – PFGE

É considerado o método de escolha em estudos epidemiológicos com bactérias de importância médica. É uma técnica utilizada para determinação de grupos clonais e identificação, baseando-se na avaliação visual dos padrões similares por número absoluto de diferenças de bandas eletroforéticas, dentro do isolados existentes. É

considerada altamente discriminatória, onde o DNA bacteriano é separado por eletroforese após digestão com endonucleases de restrição, que reconhecem um sítio limitado de sítios genômicos. Após a separação das bandas no gel, realiza-se uma análise comparativa entre os fragmentos, para identificação de clones existentes.

O método apresenta uma reprodutibilidade e capacidade discriminatória superior para UPEC, quando comparado com outros métodos de tipagem, podendo ser utilizado para diversas espécies bacterianas, sendo considerado assim padrão-ouro entre os testes moleculares de genotipagem em estudos epidemiológicos de isolados bacterianos (JOHNSON; RUSSO, 2005; TARTOF et al., 2005).

1.3.5.2 – Clonalidade das amostras de *E. coli*

Os métodos de tipagem são utilizados para identificação de clones ou grupos clonais. O PFGE no qual o DNA bacteriano é separado após digestão com uma enzima de restrição e tem a capacidade de reconhecer um número limitado de locais genômicos, é um teste utilizado para identificar cepas com o mesmo perfil eletroforético de separação de bandas de DNA ou clone (F. C. TENOVER, et al, 1995; J. R. JOHNSON; KUSKOWSKI, M. A. et al., 2005).

A disseminação clonal diz respeito à propagação de clones distintos de um micro-organismo através de uma comunidade. Estes clones são considerados carreadores de genes de resistência e são disseminados com maior facilidade (FURUYA; LOWY, 2006).

1.3.5.3 – Distribuição clonal de cepas de *E. coli* em ITU

Um fato que pode contribuir de forma significativa para a ocorrência de infecções extra-intestinais por *E. coli*, incluindo ITU, é a disseminação de cepas patogênicas. Apesar da ITU não ser normalmente considerada uma doença associada a surtos na comunidade, certas linhagens têm revelado um comportamento epidêmico, a exemplo do surto ocorrido no sul de Londres, em pacientes da comunidade, onde foi isolado nos casos, um grupo clonal de *E. coli* O15: K52: H1, associada a casos de cistites, pielonefrites e septicemia, e que apresentavam um padrão de sensibilidade incomum, com resistência a vários antibióticos. Estas

características sugerem uma epidemia com uma cepa virulenta de *E. coli* a partir de uma fonte comum na comunidade (I PHILLIPS et al., 1988).

Ao longo das últimas décadas tem sido relatado em vários países infecções extra-intestinais na comunidade, decorrentes de grupos clonais (grupos geneticamente relacionados), a exemplo dos surtos de ITU por *E. coli*. Entre estes casos podemos citar surto na Dinamarca, por *E. coli* O78: H10; no Canadá surto causado por *E. coli* produtora de β -lactamase de espectro estendido, onde a maioria dos isolados era de ITU. Espanha, e Reino Unido surtos comunitários também tem sido documentados (OLESEN et al., 1994; PITOUT et al., 2005).

Na Califórnia, Manges colaboradores (2001), relataram que um único clone de *E. coli*, designado grupo clonal A (CgA), foi responsável por cerca da metade dos isolados de *E. coli* com resistência a SXT, em 47 mulheres com ITU. Também concluiu que isolados pertencentes a este grupo clonal eram associados à resistência aos ATMs para ITUs em comunidades universitárias em Michigan e Minnesota, bem como resistência de SXT em casos de pielonefites em vários estados dos EUA. Curiosamente estes isolados clonais CgA eram relacionados com o clone O15: K52: H1, responsável pelo surto documentado em 1986 a 1987 em Londres (JOHNSON et al., 2002).

Em 2006, Manges e colaboradores, observaram que os grupos clonais encontrados em estudos anteriores, apresentavam resistência aos ATMs utilizados em ITU-AC em várias regiões. As evidências encontradas pelos autores sugeriram que o aumento da resistência entre os uropatogenos em lugares distintos, seria atribuível a um número limitado de grupos clonais de *E. coli* uropatogênicas, especialmente o grupo designado CgA e o grau de homogeneidade genética entre estes isolados em regiões geográficas distintas, poderia sugerir a existência de um fator comum, como por exemplo, um produto alimentar contaminado que poderia ser responsável pela disseminação clonal.

Boczek e colaboradores (2007) realizando uma revisão bibliográfica apontam para os relatos de emergência de um único grupo clonal (CgA) em diversos estudos epidemiológicos, entre isolados *E. coli* de ITU resistentes a SXT. Nestes estudos o grupo CgA representa até 50% dos isolados de *E. coli* isoladas a partir ITU não complicada e pielonefrite, afetando mulheres. A ocorrência de forma disseminada de

E. coli do grupo CgA em algumas comunidades tem levantado questões a respeito da disseminação desses clones e levanta a hipótese que a exposição a alimentos ou água contaminada pode representar uma forma de propagação desses patógenos (BOCZEK et al., 2007).

Em Minnesota Bockek e colaboradores (2007) analisando águas de esgoto em sete regiões diferentes dos EUA, evidenciou a presença de *E. coli* clonal (CgA) apresentando resistência a SXT (39%). Os autores concluem chamando atenção para o fato de que as taxas de resistência coletadas apenas em pacientes com ITU podem não ser representativas da verdadeira prevalência de resistência na comunidade estudada e que estudos no meio ambiente poderiam contribuir para avaliação do perfil de resistência de cepas de *E. coli* presentes na população local.

A homogeneidade genética observada nos estudos de Manges e colaboradores levaram os autores a supor que estes grupos clonais, circulantes entre os seres humanos em diferentes regiões geográficas, poderiam funcionar como reservatório intestinal e estariam contribuindo em grande parte para as ITUs comunitárias, embora, apresentassem uma diversidade genética entre eles. Estima-se que cerca de 10 a 20% destas infecções estudadas poderiam ser causadas por um grupo clonal pequeno de ExPEC e que apresentavam resistência a mais de um antimicrobiano (A. R. MANGES et al., 2008).

Em 2008, Smith e colaboradores estudando a composição clonal de 584 isolados de *E. coli* de ITU em quatro períodos diferentes, encontraram 35 grupos clonais distintos, com predomínio dos grupos: CgA, CgC, CgH, com maior predomínio do grupo CgA. Este estudo compartilha com resultados de outros estudos, em que descrevem que um número limitado de grupos clonais, são responsáveis pela maioria das ITUs de comunidade que apresentam resistência aos ATMs.

Na Dinamarca, Skjøt-Rasmussen e colaboradores (2013), ressaltam a evidência de que *E. coli* do grupo CgA, em sua maioria resistente a SXT tem uma distribuição mundial endêmica, concentrada principalmente no mundo ocidental. Estas cepas associadas à infecção do trato urinário e outras infecções extra-intestinais, podem ser responsáveis por epidemias na comunidade e foram identificadas como uma causa de ITUs-AC evidenciadas em surtos desde 2001, conforme descrito por Manges e colaboradores.

Outro estudo realizado pelo mesmo grupo, (Skjøt-Rasmussen e colaboradores) investigaram a prevalência do grupo clonal CgA em isolados de *E. coli* de bacteremia com origem no trato urinário. Foram avaliadas 196 amostras de *E. coli* isoladas de sangue e 195 de urina de pacientes internados em quatro hospitais, alguns considerados com infecção adquirida na comunidade. Realizando PFGE das amostras, encontraram 30 (15%) isolados de sangue e em 27 amostras de urina dos mesmos pacientes, pertencentes ao grupo clonal CgA e em sua maioria isoladas em bacteremia consideradas de origem comunitária, sendo que 97% foram isolados em mulheres. Entre estes isolados 50% eram resistentes a SXT em comparação a 12% das amostras não CgA. Entretanto, quando avaliaram amostras de carne na comunidade, não encontram relação clonal com estes isolados.

No Rio de Janeiro, Dias e colaboradores (2009), em um estudo de clonalidade entre amostras de *E. coli* isoladas em ITU-AC, utilizando a técnica de ERIC, encontraram 19 grupos clonais distintos, sendo que o CgA foi visto em maior número. Estes achados concordam com alguns dados mundiais, como nos EUA, estudos realizados em mulheres jovens com cistite (A. R. MANGES, et al., 2001). Também observaram que os grupos clonais apresentavam 82% de resistência a SXT e foram responsáveis por 52% das ITUs, entretanto, não puderam concluir como o grupo CgA foi introduzido e possivelmente disseminado no Rio de Janeiro.

A constatação da existência de um grupo clonal em diferentes estudos realizados em áreas geográficas distintas, apontam que o grupo clonal CgA é distribuído de forma heterogênea e mais prevalente nos EUA que outros países. Um grupo caracterizado com clonal pode afetar populações diversas, incluindo adultos e crianças, podendo causar infecção no trato urinário e infecções em outros sítios e tem forte associação com resistência a SXT. Outra característica importante é a presença de um perfil de virulência sugerindo virulência extraintestinal. A combinação de resistência e virulência pode contribuir para emergência de epidemia clonal (clone epidêmico) (JOHNSON, J.R.; KUSKOWSKI, M. A. et al., 2005).

Os isolados de *E. coli* associados a esses grupos clonais, presentes nos surtos documentados, foram reconhecidos devido à presença de um fenótipo de resistência considerado incomum nas infecções adquiridas na comunidade, além de

apresentarem em alguns casos resistência múltiplas aos ATMs e associação com infecções graves.

Apesar dos diversos estudos que tentam esclarecer a rota de transmissão e fonte destes grupos clonais, ainda não foi possível descrever de forma clara, como acontece essa transmissão e disseminação clonal, embora já tenha sido descrito a presença de colonização do trato gastrointestinal em cepas de *E. coli* resistentes aos ATMs em indivíduos procedentes de regiões com alta prevalência de resistência. Acredita-se ser relacionado à contaminação alimentar ou outros fatores ambientais (BOCZEK, et al.,2007; MANGES, et al., 2008).

A análise dos surtos citados não revelou qualquer evidência de que a transmissão pudesse acontecer pessoa-a-pessoa, mas sugere a possibilidade da transmissão por alimentos ou pela água contaminada, no entanto, limitados dados epidemiológicos disponíveis impedem conclusões definitivas em relação à transmissão de pessoa para pessoa ou de uma fonte externa.

Portanto, estudos que comparam populações definidas, homogêneas de diferentes localidades são necessários para maior entendimento da distribuição clonal e mecanismos de resistência aos ATMs dos micro-organismos envolvidos nas infecções bacterianas, especialmente *E. coli* isoladas em ITU-AC. Nosso estudo predende determinar e avaliar a distribuição clonal de *E. coli* isoladas em ITU-CA resistentes aos ATMs em dois periodos diferentes (2001 a 2002 e 2008 a 2009) procedentes de pacientes de hospitais da rede pública e privada em Salvador,Bahia.

2.0 – RACIONAL

O aumento da resistência dos micro-organismos envolvidos nas ITUs, especialmente a resistência aos ATMs utilizados rotineiramente no tratamento empírico das ITUs, tais como: cefalosporinas, AMP, aminoglicosídeos, SXT e fluoroquinolonas, é preocupante e sugere a necessidade de identificar a origem, o reservatório e as vias de transmissão destas infecções.

Vários estudos indicam que um grupo clonal de *E. coli* (CgA), causador de ITU, está globalmente disseminado e é associado a isolados apresentando resistência aos ATMs, especialmente SXT. Os resultados destes estudos sugerem a possibilidade do ser humano servir como hospedeiro e os alimentos consumidos, especialmente carnes de frango, servirem de reservatório e fontes de disseminação de cepas resistentes aos ATMs, dificultando o tratamento destas infecções e acarretando custos aumentados ao sistema de saúde.

Diante deste cenário, estudos buscando caracterizar a distribuição clonal de cepas de *E. coli* isoladas de ITU-AC podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de aquisição e disseminação de resistência aos ATMs em isolados de *E. coli* na comunidade.

3.0 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

1. Determinar a distribuição clonal de cepas de *E. coli* isoladas em ITU-AC, de acordo com o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, no período de 2001 a 2009 em Salvador, Bahia.

3.2 – Objetivos Específicos

1. Subtipar as cepas de *E. coli* isoladas em ITU-AC, utilizando técnica de alto poder discriminatório;
2. Analisar a composição clonal de *E. coli*, de acordo com o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, nos dois períodos do estudo.
3. Comparar a composição clonal das cepas resistentes de *E. coli* isoladas em ITU-AC em Salvador entre os dois períodos estudados.
4. Identificar mudanças na distribuição clonal das cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos no período de 2001 a 2009.

4.0 – METODOLOGIA

4.1 – Local de Estudo

Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística e Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ, Salvador, Bahia.

4.2 – Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de corte-transversal para avaliar a composição clonal das cepas de *E. coli* isoladas de ITU-AC em pacientes ambulatoriais atendidos em Salvador, Bahia.

4.3 – População

Amostras consecutivas de cepas de *E. coli* isoladas de urocultura de pacientes ambulatoriais atendidos em serviços da rede pública e privada no período compreendido entre 2001 a 2002 e da rede privada no período entre 2008 a 2009.

4.3.1 – Critérios de Inclusão

Foram incluídas cepas de *E. coli* isoladas de ITU em pacientes de ambos os sexos, sem restrições quanto à idade e com ITU definida por urocultura positiva ($>10^5$ Unidades Formadoras de Colônias-UFC/mL).

4.3.2 – Critérios de Exclusão

Pacientes com história de internamento ou procedimento urológico hospitalar nos últimos 30 dias e pacientes com episódio de ITU que já tenham sido incluídos no estudo.

4.3.3 – Escolha dos isolados para subtipagem

Foram seleccionadas para realização subtipagem por PFGE: uma amostra aleatória dos isolados de *E. coli* nos seguintes grupos: i) cepas susceptíveis a todos ATMs testados em 2001 a 2002 (n=57/155) e em 2008 a 2009 (n=62/160), ii) cepas sensíveis à CIP e resistentes à SXT em 2001 a 2002 (n=60/125) e 2008 a 2009 (n=56/119), iii) todas as cepas resistentes à CIP e SXT e (n=65 em 2001 a 2002 e n=35 em 2008 a 2009) (Figura 3).

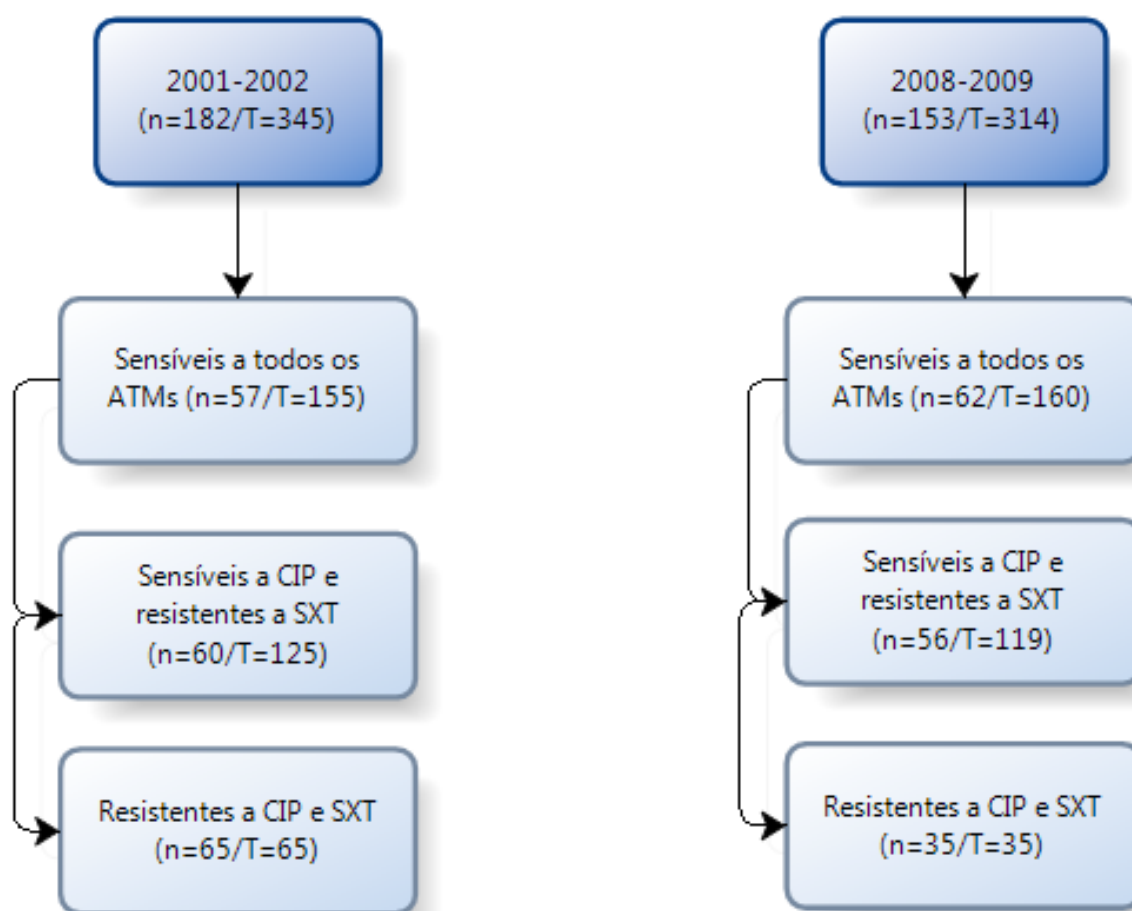


Figura 3. Fluxograma das amostras seleccionadas aleatoriamente para realização de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

4.4 – Manutenção das Amostras de *E. coli*

Após o isolamento, cada uma das amostras obtidas foi repicada em agar Macconkey para avaliar a pureza da cultura e, em seguida, congelada em tubos tipo criotubos em caldo de BHI com 10% de glicerol em freezer a - 80°C.

4.5 – Genotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado - (PFGE)

A subtipagem dos isolados de ITU-AC foi realizada utilizando um protocolo modificado para subtipagem de *E. coli* (O157:H7) por PFGE, estabelecido pelo CDC (BENDER et al., 1997). Como controle de qualidade utilizamos a cepa ATCC 25922 (cepa padrão) em todas as corridas. Para realização do PFGE, cada isolado foi inicialmente repicado por duas vezes em Agar Columbia e incubado em estufa a 37°C por 18 a 24 horas. Após esse período foi feita uma suspensão bacteriana em 500µL de “PIV” (NaCl 1M em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,6) e ajustada a escala 1,0 de MacFarland, onde adicionou-se 500µL de agarose “Low Melting Point” a 2% a 56°C para o preparo dos “plugs”. Após solidificação, os “plugs” foram tratados com proteinase K (25mg/mL) “overnight” – 1mL do tampão ES (EDTA tetrassódico 1M, pH 8,0; sarcosil 5%) e 40µL de proteinase K. Durante três dias, os “plugs” foram lavados sucessivamente com tampão “TE” (10 mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0) em temperatura ambiente. Após as lavagens, foi realizada a restrição enzimática (temperatura de 37°C “overnight”) com a enzima *Xba*I (12U/µL).

Na corrida eletroforética, foi utilizado o CHEF-DR[®] II, sob as condições de tempo inicial de 2,2 segundos e final de 54,2 segundos, voltagem de 6 V/cm e tempo de corrida de 17 horas. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio. Para determinação de perfil de mobilidade eletroforética, foi utilizado o programa Gel Compar II[®] (Bio-Rad). A comparação das amostras foi realizada a partir de dendrograma utilizando o coeficiente de Dice com tolerância de 1,5%.

4.5.1 – Definição de grupo clonal

Os grupos clonais foram caracterizados com base nos critérios utilizados por Tenover e colaboradores (1995), onde os isolados que apresentaram padrão de PFGE idênticos foram considerados geneticamente indistinguíveis, os que apresentaram 1 a 3 bandas diferentes foram caracterizados como intimamente relacionados e finalmente os que apresentaram quatro a seis bandas diferentes foram considerados possivelmente relacionados. Grupo clonal foi definido como ≥ 2 isolados mostrando padrões similares (TENOVER, et al, 1995).

4.5.2 - Análise Estatística (PFGE)

A significância estatística das diferenças na distribuição das proporções dos grupos clonais foi avaliada através do teste do Qui-quadrado. Foram considerados significativos estatisticamente os resultados com $p < 0,05$ (bi-caudal). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico Stata versão 11 ®.

4.6 - Considerações Éticas

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Parecer nº 180/2008). A análise dos dados e todos os testes do protocolo foram realizados sem conhecimento da identidade dos participantes por parte da equipe de investigadores. Dessa maneira, foi preservada a confidencialidade das informações e a privacidade dos indivíduos incluídos no protocolo.

5.0 – RESULTADOS

No total, 874 cepas de *E. coli* foram isoladas de pacientes com ITU-AC em Salvador, em dois períodos diferentes, sendo 463 no primeiro período (2001 a 2002) e 411 no segundo período (2008 a 2009). As amostras foram isoladas em ITU-AC em pacientes procedentes de emergências e ambulatórios de dois hospitais públicos e um hospital da rede privada em Salvador, Bahia.

As prevalências de resistência para os 463 isolados de *E. coli* em 2001 a 2002 estão sumarizadas na Tabela 1. As maiores taxas de resistência foram para AMP (49%) e SXT (42%). Quatorze por cento dos isolados avaliados apresentaram resistência a CIP. Para a maioria dos ATMs testados, a prevalência de resistência foi semelhante entre homens e mulheres. Entretanto, os indivíduos de sexo masculino apresentaram taxa significativamente maior de resistência para os seguintes ATMs: nitrofurantoína, ácido nalidíxico e CIP.

Tabela 1 - Prevalência (%) de resistência antimicrobiana em 463 *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário adquirida na comunidade estratificado por sexo, Salvador, Bahia, 2001 a 2002.

	Mulheres		Homens		Total		Valor de p*
	n=378	%	n=85	%	n=463	%	
Amicacina	8	2	4	5	12	3	0,16
Ampicilina	189	50	39	46	228	49	0,58
Cefepime	4	1	1	1	5	1	0,91
Cefoxitina	8	2	4	5	12	2	0,12
Ceftazidima	4	1	1	1	5	1	0,73
Ceftriaxona	4	1	0	0	4	1	0,53
Cefalotina	42	11	11	13	53	12	0,61
Cloranfenicol	83	22	15	18	98	22	0,36
Ciprofloxacina	45	12	20	24	65	14	0,009
Gentamicina	8	2	4	5	12	2	0,12
Ácido nalidíxico	57	15	22	26	79	17	0,02
Nitrofurantíona	8	2	9	10	16	4	0,001
Norfloxacina	49	13	17	20	66	14	0,10
Sulfametoxazol-Trimetoprim	159	42	33	39	192	42	0,65
Tetraciclina	155	41	31	37	186	40	0,54

* Teste Qui-quadrado

Nota: Dentre estes isolados 155 (33.5%) eram sensíveis a todos os antimicrobianos testados

Na Tabela 2, apresentamos o perfil de sensibilidade dos 411 isolados de *E. coli* no segundo período do estudo (2008 a 2009). As taxas de resistência para os ATMs testados não diferiram significativamente entre homens, mulheres e crianças, apesar dos nossos dados sugerirem que as taxas de resistência a fluoroquinolonas sejam menores entre as crianças (1%) comparadas aos homens (10 a 11%) e mulheres (9 a 10%).

Tabela 2 - Prevalência (%) de resistência antimicrobiana em 411 *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário adquirida na comunidade estratificado por sexo, Salvador, Bahia, 2008 a 2009.

	Mulheres		Homens		Crianças		Total		Valor de p*
	n=290	%	n=52	%	n=69	%	n=411	%	
Amicacina	0	0	0	0	1	1	1	1	0,083
Ampicilina	136	47	28	54	36	52	200	49	0,092
Cefepime	0	0	0	0	0	0	0	0	0,811
Cefuroxima	0	0	0	0	1	2	1	1	0,083
Ceftazidima	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Ceftriaxona	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Cefalotina	93	32	18	34	26	37	137	33	0,707
Ciprofloxacina	29	10	6	11	1	1	35	9	0,063
Gentamicina	3	1	1	2	2	3	6	2	0,488
Nitrofurantíona	3	1	2	4	1	1	6	2	0,165
Sulfametoxazol-Trimetoprim	107	37	14	27	26	38	147	36	0,676
Tetraciclina	75	26	13	25	13	19	101	26	0,460

* Teste Qui-quadrado

Nota: Dentre estes isolados 160 (38.9%) eram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

De forma geral, as maiores taxas de resistência foram encontradas para AMP (49%), SXT (36%), CF (33%), tetraciclina (26%) e CIP (9%). Na Tabela 3, comparamos a prevalência de resistência aos ATMs nos isolados de *E. coli* de acordo com sexo nos diferentes períodos do estudo. Verificamos que as taxas de resistência não mudaram de forma significativa para a maioria dos ATMs testados, exceto para CF cuja prevalência aumentou de duas a três vezes e para amicacina, cuja taxa de resistência diminuiu entre as mulheres no intervalo de tempo avaliado.

Tabela 3. Prevalência (%) de resistência a antimicrobianos em cepas de *Escherichia coli* isoladas em pacientes com infecção do trato urinário adquirida na comunidade em Salvador, comparação de dois períodos: 2001 a 2002 e 2008 a 2009.

Antimicrobianos	Mulheres			Homens		
	2001-2002 (n=378)	2008-2009 (n=290)	p-valor	2001-2002 (n=85)	2008-2009 (n=52)	p-valor
Amicacina	2	0	0,040	6	0	0,193
Ampicilina	51	47	0,287	47	54	0,403
Cefepime	1	0	0,233	1	0	*
Ceftriaxona	1	0	0,233	0	0	*
Cefalotina	11	32	0,001	14	34	0,004
Ciprofloxacina	11	10	0,705	24	11	0,065
Gentamicina	2	1	0,499	5	2	0,718
Nitrofurantoina	2	1	0,499	11	4	0,286
Sulfametoxazol+trimetoprim	43	37	0,102	40	27	0,131

*Não foi possível calcular, valor esperado menor que 1.

Na Tabela 4, apresentamos a distribuição de resistência na população estudada. Apesar do aumento do percentual de micro-organismos considerados multirresistentes (resistentes a três ou mais classes de antibióticos) nos dois períodos avaliados, esta diferença não apresentou significância estatística.

Tabela 4. Distribuição (%) de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas em pacientes com infecção do trato urinário adquiridas na comunidade, Salvador, Bahia, 2000 a 2001 (n=463) e 2008 a 2009 (n=411).

n° de resistências a antimicrobianos	n (%)		n (%)		Valor de p ^a
	2001-2002		2008-2009		
0	155	(34)	160	(39)	0,551
1	62	(13)	44	(11)	
2	79	(17)	35	(9)	
≥3	167	(36)	172	(46)	

^a Qui-quadrado

Do total de 335 cepas de *E. coli* selecionadas, 275 (82,1%) foram cultivadas com sucesso a partir das alíquotas congeladas para realização de tipagem através de PFGE. O restante dos isolados não estava mais viável. Na figura 4, apresentamos a distribuição das amostras selecionadas e tipadas.

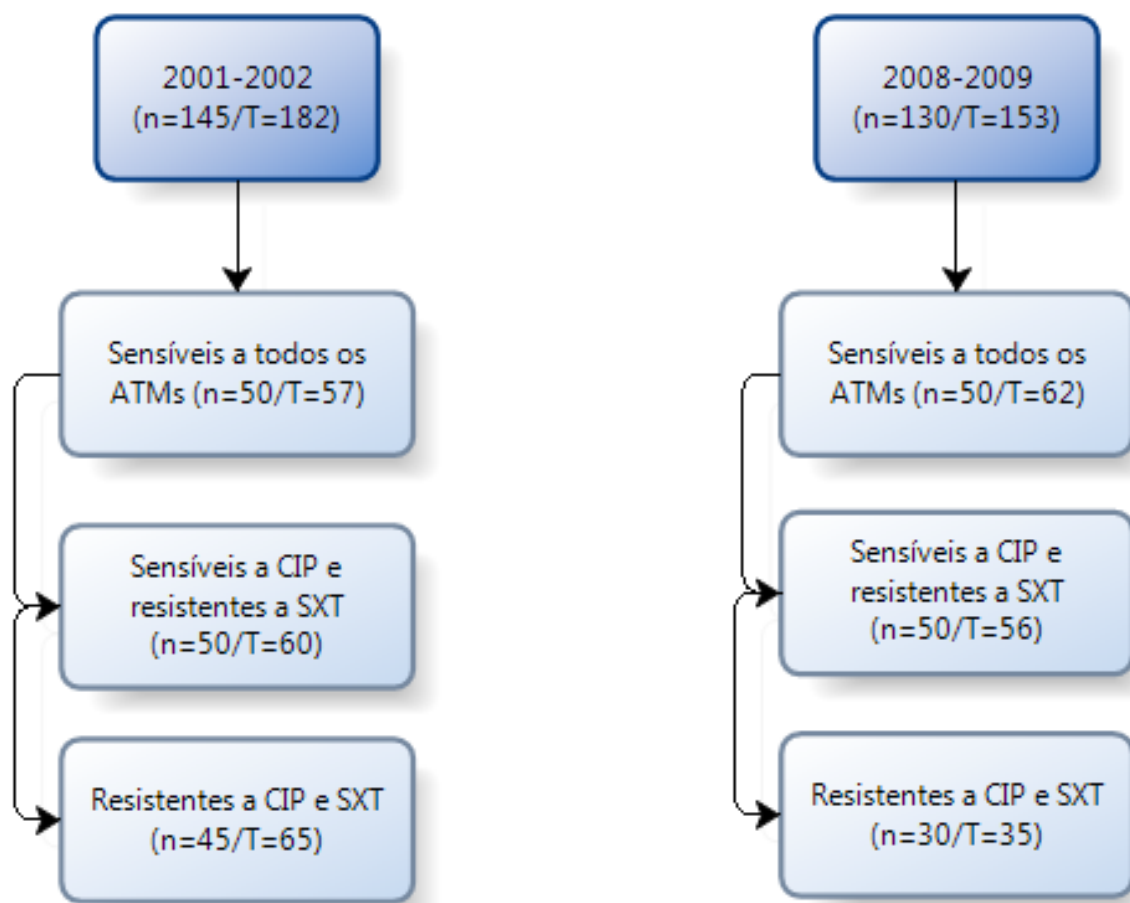


Figura 4. Distribuição do número de amostras de *E. coli* selecionadas inicialmente para realização de PFGE e do número final de amostras tipadas.

O dendrograma na Figura 5, gerado pela análise da tipagem das cepas no programa Gelcompar®, apresenta os diferentes grupos com respectivos padrões clonais. Entre os isolados analisados, 75 eram resistentes a CIP e SXT, 100 eram sensíveis a CIP e resistentes a SXT e 100 eram sensíveis a todos os ATMs testados. A análise genotípica das 275 cepas de *E. coli* pela técnica de PFGE permitiu

caracterizar a presença de 31 grupos clonais distintos, que correspondiam a 142 cepas (52% de todas as cepas tipadas). Os padrões de restrição resultantes foram identificados com letras, da seguinte forma: os isolados que apresentaram padrões de restrição indistinguíveis foram designados com a mesma letra, por exemplo, a letra A; os que eram considerados possivelmente relacionados a grupos clonais segundo o critério de TENOVER (1995) foram considerados subtipos e designados como: A1, A2, etc. Padrões que diferiram substancialmente dos padrões uns dos outros foram classificados como não pertencentes a grupos clonais, e assim, foram classificados com outras letras como: B, C, D, AC, etc.

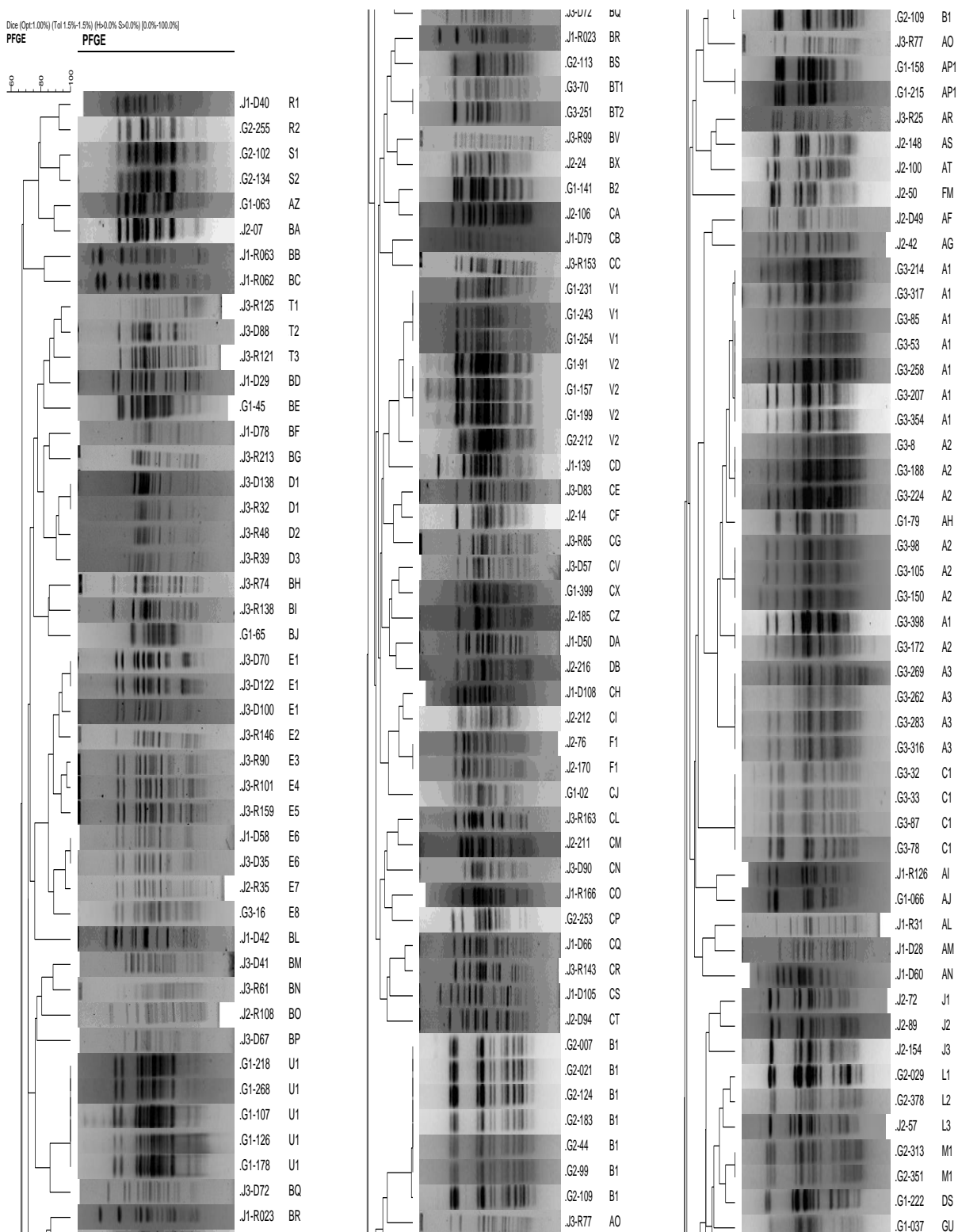


Figura 5. Padrões de PFGE (XbaI) das 275 cepas (total estudado) de *Escherichia coli*, Salvador, 2001 a 2009.

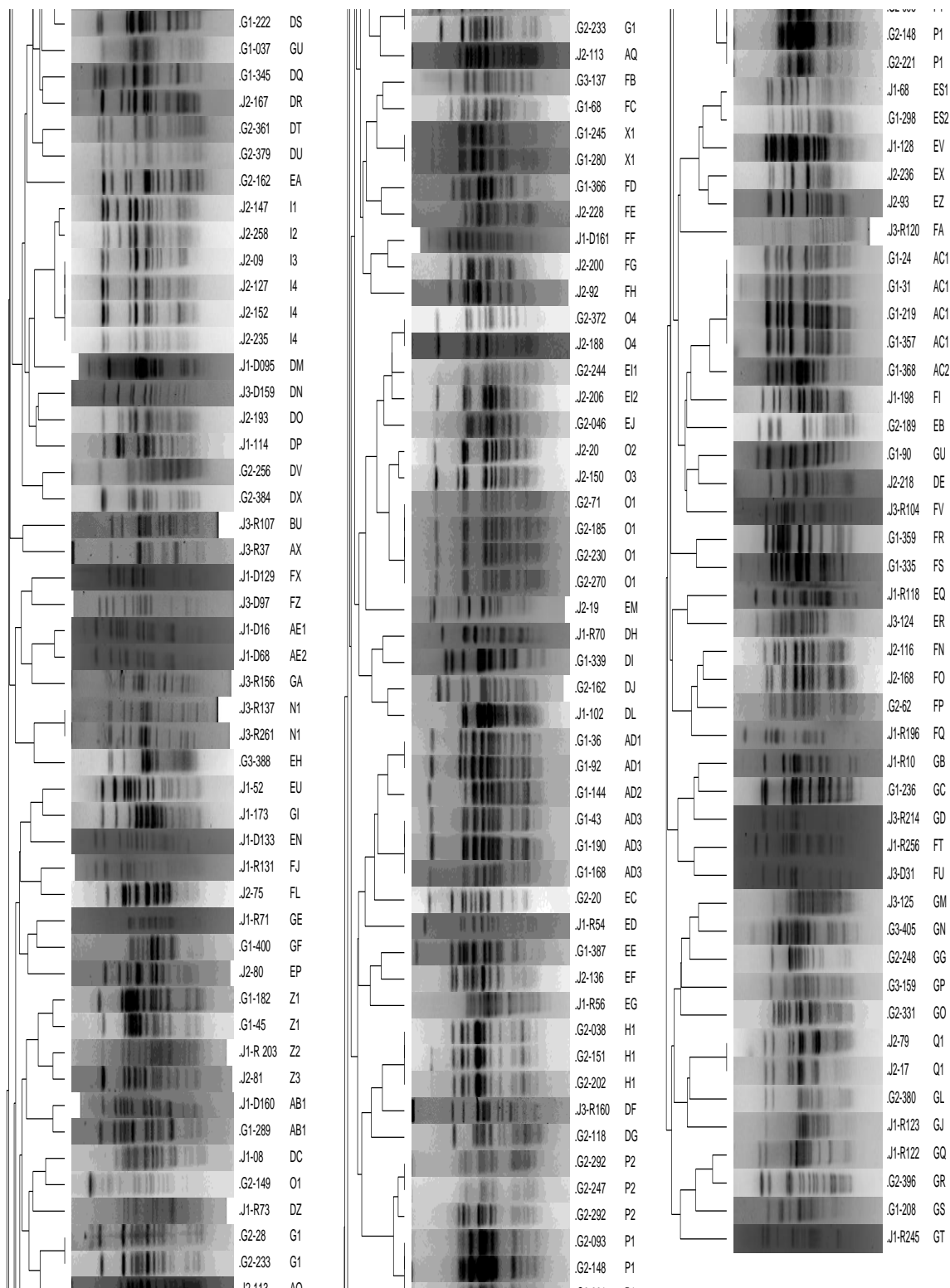


Figura 5. Padrões de PFGE (XbaI) das 275 cepas (total estudado) de *Escherichia coli*, Salvador, 2001 a 2009 (continuação).

Na análise da distribuição clonal das cepas segundo os fenótipos de resistência aos ATMs (Figura 6), inicialmente comparamos os grupos clonais que apresentaram resistência a três ou mais classes de ATMs (incluindo CIP e SXT), considerados multidroga resistentes. Nas amostras isoladas no período de 2001 a 2002, os grupos clonais mais freqüentes foram: CgE (18%), CgD (9%), CgT (7%) e CgN (4%), correspondendo a 38% das amostras tipadas, o restante dos isolados (n=28, 62%) foi considerado não agrupável. Já no segundo período (2008 a 2009), o grupo clonal CgA foi identificado em 19 das 30 amostras tipadas, correspondendo a 63% do total, seguido pelos grupos CgC (13%), CgBT (7%) e CgE (3%). Vale ressaltar que 86% das amostras se concentraram em quatro grupos clonais e que o CgA isoladamente correspondeu a 73% de todas as amostras agrupáveis. As demais amostras (14%) foram consideradas não agrupáveis por apresentarem apenas um isolado de cada (Tabela 5)

Tabela 5. Distribuição clonal (%) de 75 cepas de *Escherichia coli* multidroga resistentes (MDR) isoladas em pacientes com infecção do trato urinário adquirida na comunidade, Salvador, Bahia, 2001 a 2009.

Grupo clonal	MDR	
	2001-2002 n=45	2008-2009 n=30
Grupo A	0 (0) ^a	19 (63)
Grupo C	0 (0)	4 (13)
Grupo BT	0 (0)	2 (7)
Grupo E	8 (18)	1 (3)
Grupo D	4 (9)	0 (0)
Grupo T	3 (7)	0 (0)
Grupo N	2 (4)	0 (0)
Não agrupáveis	28 (62)	4 (14)

^a n (%)

R= Resistente

MDR= Resistência a ≥ 3 classes de antimicrobianos (incluindo CIP e SXT)

(Opt:1.00%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE

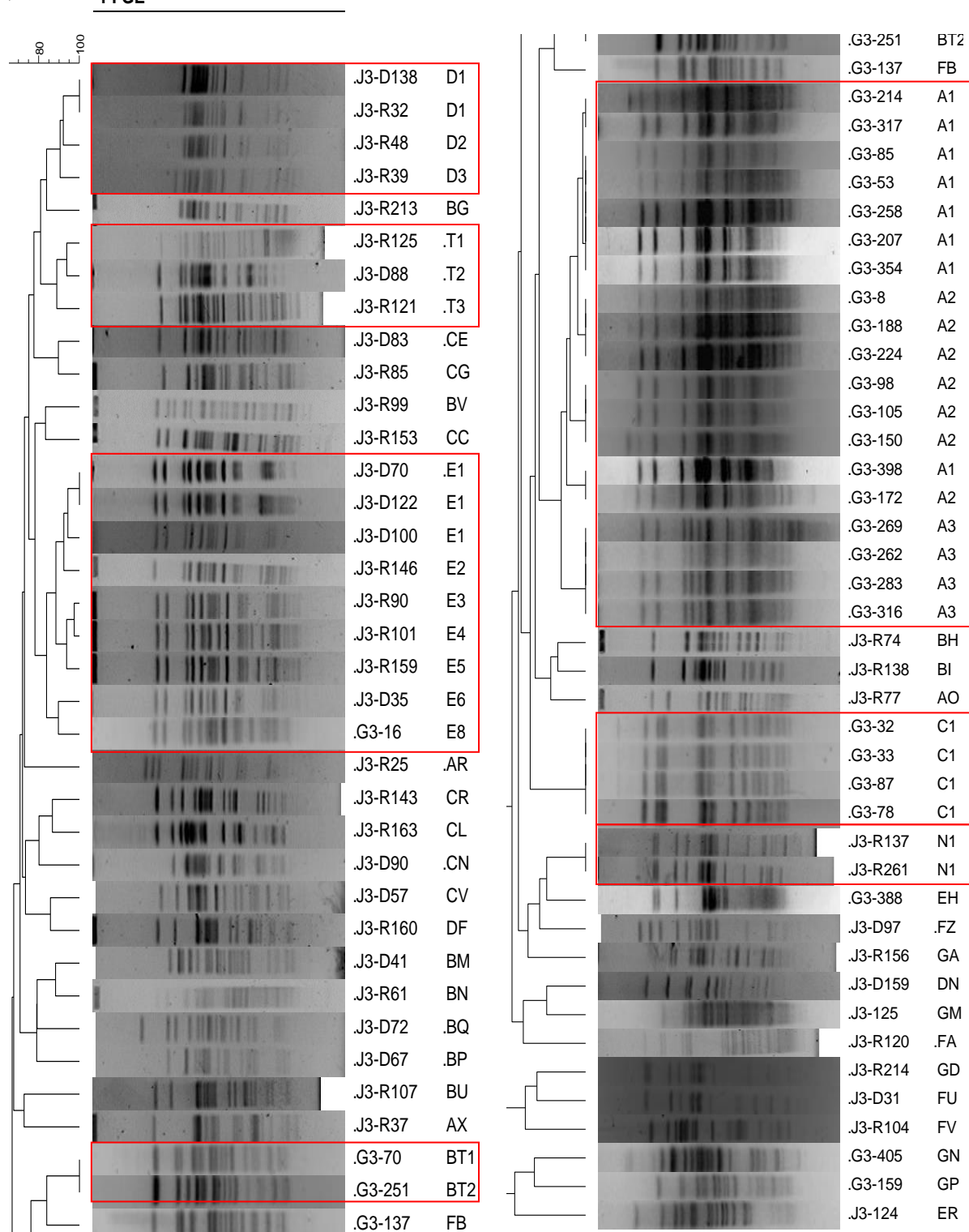


FIGURA 6. Padrões de PFGE (XbaI) de 75 cepas de *Escherichia coli* apresentando multidroga resistência, Salvador, 2001 a 2009 (em destaque os principais grupos clonais).

Na avaliação da distribuição clonal dos isolados que apresentaram sensibilidade a CIP e resistência a SXT (Figura 7), podemos constatar que houve maior diversidade clonal. No primeiro período (2001 a 2002), 40% das cepas correspondiam a nove grupos clonais, os mais comumente encontrados foram: 12% no grupo clonal CgI, 6% no CgO e CgJ, 4% no CgF e CgQ. Entre as amostras tipadas, 30 (60%) foram consideradas não agrupáveis. No segundo período (2008 a 2009), houve também grande diversidade clonal, 14% pertenciam ao grupo CgB, 12% ao CgP e CgO, 6% ao CgH e 4% aos grupos CgG, CgL, CgM e CgS. As amostras consideradas não agrupáveis ocorreram num percentual inferior (36%) quando comparadas com as amostras do período de 2001 a 2002 (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição clonal (%) de 100 cepas de *Escherichia coli* sensíveis a ciprofloxacina e resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim isoladas de ITU-AC, Salvador, Bahia, 2001 a 2009.

Grupo clonal	Ciprofloxacina (S) e Sulfametoxazol/trimetoprim (R)	
	2001-2002 n=50	2008-2009 n=50
Grupo B	0 (0) ^a	7 (14)
Grupo O	3 (6)	6 (12)
Grupo P	0 (0)	6 (12)
Grupo H	0 (0)	3 (6)
Grupo G	0 (0)	2 (4)
Grupo L	1 (2)	2 (4)
Grupo M	0 (0)	2 (4)
Grupo S	0 (0)	2 (4)
Grupo EI	1 (2)	1 (2)
Grupo R	0 (0)	1 (2)
Grupo E	1 (2)	0 (0)
Grupo F	2 (4)	0 (0)
Grupo I	6 (12)	0 (0)
Grupo J	3 (6)	0 (0)
Grupo Q	2 (4)	0 (0)
Grupo Z	1 (2)	0 (0)
Não agrupáveis	30 (60)	18 (36)

^a n (%)

R = Resistente, S = Sensíveis

ITU-AC = Infecção do trato urinário adquirida na comunidade

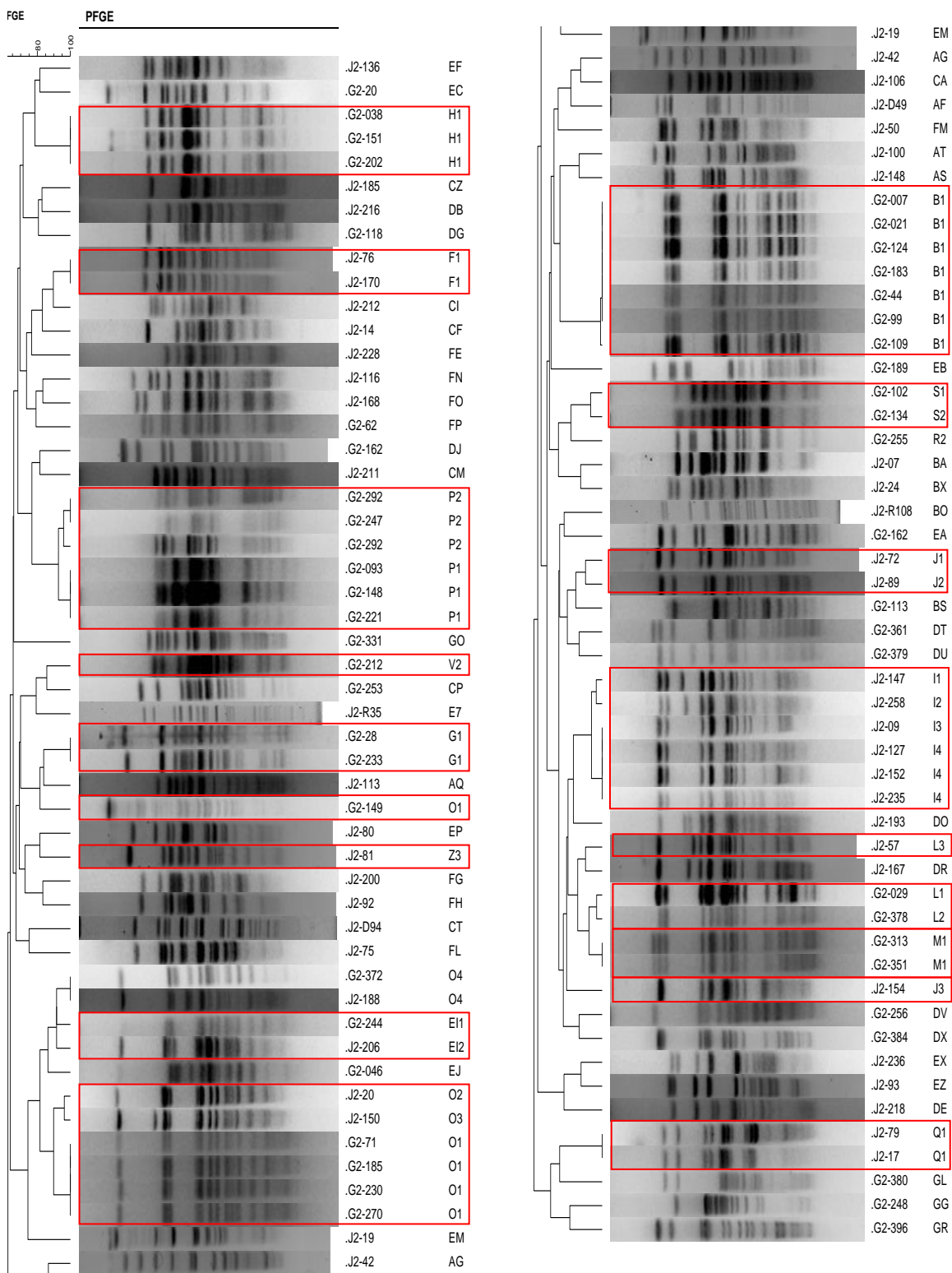


FIGURA 7. Padrões de PFGE (XbaI) de 100 cepas de *Escherichia coli* apresentando sensibilidade à ciprofloxacina e resistência à sulfametoxazol-trimetoprim, Salvador, 2001 a 2009 (em destaque os principais grupos clonais).

Na Tabela 7, analisando a composição clonal das amostras de *E. coli* que apresentavam sensibilidade a todos ATMs testados (Figura 8), observamos novamente heterogenicidade clonal. Identificamos a presença de seis diferentes grupos clonais no primeiro período (2001 a 2002): 4% no CgAE e 2% em cada um dos seguintes grupos CgE, CgR, CgZ, CgAB e CgES. Já no segundo período (2008-2009), detectamos um maior número de grupos clonais (9), assim distribuídos: CgAD e CgV (12%), CgU e CgAC (10% cada), CgX, CgZ e CgAP (4% cada) e CgES e CgAB (2% cada). No total, 30 amostras foram consideradas agrupáveis (60%) e 20 não agrupáveis (40%). Este percentual foi menor do que no período anterior, quando 43 (86%) foram consideradas não agrupáveis.

Tabela 7. Distribuição clonal (%) de 100 cepas de *Escherichia coli* sensíveis a todos antimicrobianos isoladas em pacientes com ITU-AC no período de 2001 a 2009, Salvador, Bahia.

Grupo clonal	Sensível a todos ATMs testados	
	2001-2002	2008-2009
	n=50	n=50
Grupo V	0(0)	6(12)
Grupo AD	0(0)	6(12)
Grupo AC	0(0)	5(10)
Grupo U	0(0)	5(10)
Grupo AP	0(0)	2(4)
Grupo X	0(0)	2(4)
Grupo Z	1(2)	2(4)
Grupo ES	1(2)	1(2)
Grupo AB	1(2)	1(2)
Grupo AE	2(4)	0(0)
Grupo E	1(2)	0(0)
Grupo R	1(2)	0(0)
Não agrupáveis	43(86)	20(40)

^a n (%)

R = Resistente, S = Sensível

ITU-AC = Infecção do trato urinário adquirida na comunidade

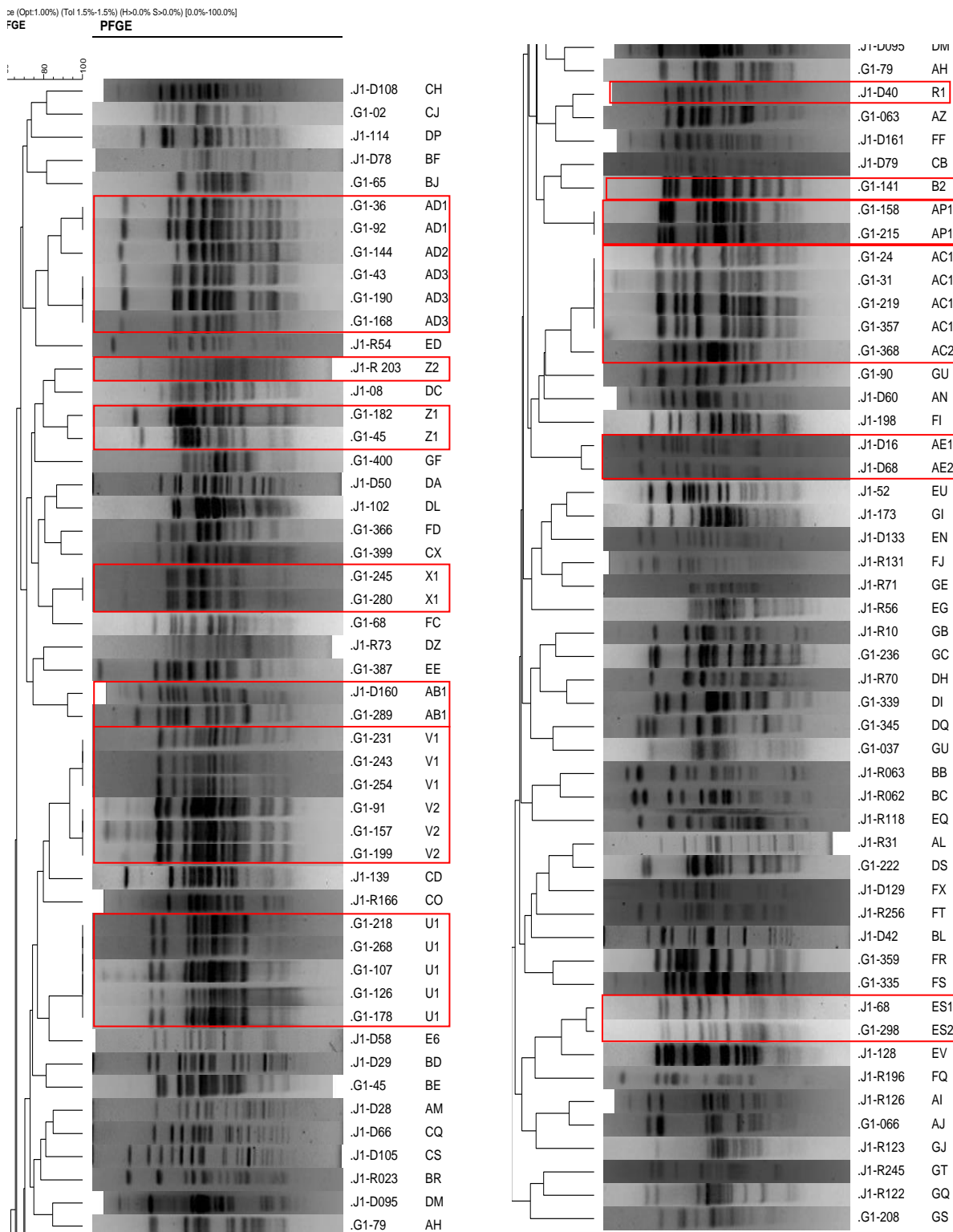


FIGURA 8. Padrões de PFGE (XbaI) de 100 cepas de *Escherichia coli* apresentando sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, Salvador, 2001 a 2009 (em destaque os principais grupos clonais).

Em seguida, apresentamos a distribuição clonal dos isolados, segundo o perfil de sensibilidade aos ATMs em cada período estudado. Iniciando pela tabela 8, onde exibimos as 145 amostras tipadas por PFGE no período de 2001 a 2002. Podemos observar maior diversidade clonal entre as cepas sensíveis a todos os ATMs, comparadas às cepas com alguma resistência e às cepas multidroga resistentes. Entre as cepas sensíveis, 86% foram consideradas não agrupáveis comparados a 60% e 62% entre as cepas com alguma resistência e as multirresistentes, respectivamente. Além disso, quatro grupos clonais representavam 38% do total das cepas multidroga resistentes e nove grupos clonais compreendiam 40% do total das cepas com alguma resistência. Já nas cepas que apresentaram sensibilidade a todos ATMs, encontramos seis grupos clonais diferentes com percentuais variando de 2 a 4% entre as amostras agrupáveis.

Tabela 8. Distribuição clonal de 145 cepas de *Escherichia coli* isoladas de ITU-AC, de acordo com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, Salvador, Bahia, 2001 a 2002.

Grupo clonal	CIP (R) e SXT (R)	CIP (S) e SXT (R)	Sensíveis a todos ATMs
Grupo E	8 (18)	1(2)	1(2)
Grupo D	4 (9)	0(0)	0(0)
Grupo T	3 (7)	0(0)	0(0)
Grupo N	2 (4)	0(0)	0(0)
Grupo I	0(0)	6 (12)	0(0)
Grupo J	0(0)	3 (6)	0(0)
Grupo O	0(0)	3 (6)	0(0)
Grupo Q	0(0)	2(4)	0(0)
Grupo F	0(0)	2 (4)	0(0)
Grupo EI	0(0)	1(2)	0(0)
Grupo L	0(0)	1 (2)	0(0)
Grupo Z	0(0)	1(2)	1(2)
Grupo AE	0(0)	0(0)	2(4)
Grupo AB	0(0)	0(0)	1(2)
Grupo ES	0(0)	0(0)	1(2)
Grupo R	0(0)	0(0)	1(2)
Grupo AP	0(0)	0(0)	0(0)
Não agrupáveis	28(62)	30(60)	43(86)

^a n (%)

R = Resistente

S = Sensível

Avaliando a composição clonal de acordo com o perfil de sensibilidade aos ATMs nas amostras do segundo período do estudo (Tabela 9), observamos um maior predomínio clonal, particularmente entre as amostras consideradas multidroga resistentes. Neste grupo, 19 das 30 amostras (63%) pertenciam a um mesmo clone, denominado CgA, seguido pelo CgC (13%), CgBT (7%) e CgE (3%), totalizando 86% das cepas nesta categoria. Apesar da alta prevalência do CgA nas amostras do período de 2008 a 2009, este clone não foi identificado nas cepas analisadas no período anterior de 2001 a 2002. Os isolados que apresentavam resistência à SXT e mantinham sensibilidade para CIP se concentraram em dez diferentes grupos clonais, totalizando 64% das amostras. Verificamos também uma diversidade clonal nos isolados multissensíveis, onde 60% das amostras se agruparam em nove grupos diferentes, semelhante ao observado no período inicial do estudo.

Tabela 9. Distribuição clonal de 130 cepas de *E. coli* de acordo com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, isoladas de ITU-AC no período de 2008 a 2009, Salvador, Bahia.

Grupo clonal	CIP (R) e SXT (R)	CIP (S) e SXT (R)	Sensíveis a todos ATMs
Grupo A	19 (63)	0(0)	0(0)
Grupo C	4 (13)	0(0)	0(0)
Grupo E	1 (3)	0(0)	0(0)
Grupo BT	2 (7)	0(0)	0(0)
Grupo B	0(0)	7(14)	0(0)
Grupo O	0(0)	6(12)	0(0)
Grupo P	0(0)	6(12)	0(0)
Grupo H	0(0)	3 (6)	0(0)
Grupo G	0(0)	2 (4)	0(0)
Grupo L	0(0)	2 (4)	0(0)
Grupo M	0(0)	2 (4)	0(0)
Grupo S	0(0)	2(4)	0(0)
Grupo R	0(0)	1(2)	0(0)
Grupo EI	0(0)	1(2)	0(0)
Grupo AD	0(0)	0(0)	6(12)
Grupo V	0(0)	0(0)	6(12)
Grupo AC	0(0)	0(0)	5(10)
Grupo U	0(0)	0(0)	5(10)
Grupo AP	0(0)	0(0)	2(4)
Grupo X	0(0)	0(0)	2(4)
Grupo Z	0(0)	0(0)	2(4)
Grupo AB	0(0)	0(0)	1(2)
Grupo ES	0(0)	0(0)	1(2)
Não agrupáveis	4(14)	18(36)	20(40)

^a n (%)

R = Resistente

S = Sensível

6.0 – DISCUSSÃO

O presente estudo avalia a prevalência da resistência de amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com ITU procedentes da comunidade, no período de 2001 a 2008, na cidade de Salvador, Bahia. Foram analisadas as taxas de resistência aos ATMs mais usualmente utilizados no tratamento empírico das ITUs. Avaliamos também a distribuição clonal dos isolados de *E. coli* de acordo com o perfil de resistência aos ATMs.

Encontramos uma alta prevalência de resistência a antimicrobianos como AMP, CF e SXT. Esses achados implicam na contra-indicação do uso destes ATMs no tratamento empírico de ITU-AC na comunidade estudada. Nossos achados são similares aos encontrados por Kiffer e colaboradores (2007) em São Paulo. Neste estado, avaliando 31.716 isolados de ITU em pacientes ambulatoriais, as taxas de resistência de *E. coli* a AMP e SXT foram de 43% e 34%, respectivamente.

A alta prevalência de resistência a AMP no nosso estudo (49%) também tem sido descrito por outros autores no Brasil e em outras partes do mundo (CAMARGO; et al., 2002; V. GUPTA; YADAV; JOSHI, 2002; ALOS et al., 2005; ARSLAN et al., 2005; DROMIGNY et al., 2005; ANDRADE et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; GOBERNADO et al., 2007b; KIFFER et al., 2007; DE BACKER D et al., 2008; KOTHARI; SAGAR, 2008). As taxas de resistência a SXT (36 a 42%) na nossa população de estudo são similares às taxas globais reportadas, que variam de 15% a 22% na América do Norte (DYER; SANKARY; DAWSON, 1998; MANGES, et al., 2001; KARLOWSKY et al., 2002; KARLOWSKY et al., 2003; ZHANEL et al., 2006), de 23 a 61% na América Latina (CAMARGO et al., 2002; ANDRADE et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; KIFFER et al., 2007), de 14 a 26% na Europa (ALOS et al., 2005; GOBERNADO et al., 2007a; DE BACKER D et al., 2008; LOBEL et al., 2008) e de 36 a 76% na Ásia (GUPTA, 2002; ARSLAN et al., 2005; AKRAM; SHAHID; KHAN, 2007; KOTHARI; SAGAR, 2008). Diante das altas taxas de resistência à SXT na população estudada, o uso deste antimicrobiano não está indicado para o

tratamento empírico das ITU-AC. A causa da variação das taxas de resistência nos diferentes trabalhos publicados não é aparente, mas pode refletir diferenças nas metodologias empregadas e na seleção das amostras. Segundo Gupta e colaboradores, 2001, o uso difundido de SXT como terapia profilática para pacientes com infecção por HIV ou AIDS ou como profilaxia para outras doenças infecciosas pode ter levado ao aumento das taxas de resistência à SXT.

Encontramos taxas de resistência à CIP relativamente altas, variando de 9% a 14%, especialmente quando comparadas àquelas em estudos realizados em ITU-AC nos EUA (DYER; SANKARY; DAWSON, 1998; KARLOWSKY et al., 2002; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007) e no Canadá (ZHANEL et al., 2000). Nestes países, as taxas variaram de 0 a 3%. Numa revisão dos dados publicados no Brasil, estudos realizados por Andrade e colaboradores (2006) e Kiffer e colaboradores (2007) reportaram taxas de resistência à CIP comparáveis à nossa, 10% e 12% respectivamente. Taxas ainda mais elevadas tem sido reportadas, 31 a 72% no México, 25% na Argentina, 28% na Venezuela (ANDRADE et al., 2006), 18% na Espanha (GOBERNADO et al., 2007b), 17 a 25% na Turquia (ARSLAN et al., 2005), 19% no Senegal (DROMIGNY et al., 2005) e 38 a 72% na Índia (V. GUPTA; YADAV; JOSHI, 2002; ARSLAN et al., 2005; DROMIGNY et al., 2005; ANDRADE et al., 2006; AKRAM; SHAHID; KHAN, 2007; GOBERNADO et al., 2007b; KOTHARI; SAGAR, 2008). No entanto, os critérios de inclusão na maioria destes trabalhos, não foram suficientemente restritivos para que apenas casos de ITU-AC fossem incluídos. Portanto, não podemos afastar a possibilidade da inclusão de casos de ITUs adquiridas no ambiente hospitalar inadvertidamente, levando à superestimação das taxas de resistência à CIP.

Apesar de recentemente as fluoroquinolonas terem sido padronizadas como uma classe de antibióticos de primeira escolha para o tratamento empírico das ITU-AC e até das ITUs de origem hospitalar, taxas elevadas de resistência também são descritas em outras partes do mundo (ARSLAN et al., 2005; ANDRADE et al., 2006; GOBERNADO et al., 2007a). Segundo Colodner e colaboradores (2008), o uso intensivo das fluoroquinolonas no tratamento de infecções em humanos e animais tem levado à disseminação da resistência bacteriana. O aumento da prevalência de

infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos torna o tratamento empírico destas infecções mais difícil. Dados locais sobre os padrões de susceptibilidade de patógenos para agentes ATMs podem levar a uma melhor adaptação de protocolos de tratamento empírico (LAPCHIK, 1995).

A elevação da prevalência de resistência às fluoroquinolonas, especialmente entre as *E. coli* (UPEC), é preocupante, alertando para a necessidade de identificar sua origem, reservatório e vias de disseminação. Nossos achados sinalizam que este antibiótico ainda tem indicação no tratamento empírico da ITU-CA, já que a sensibilidade a estes ATMs variou de 80 a 90%. Entretanto, a taxa de resistência encontrada já é maior do que em outras comunidades e deve ser monitorada para a detecção de eventual aumento que limite a utilização deste antimicrobiano na terapia empírica de ITU-AC.

Comparando as taxas de resistência aos ATMs nos dois períodos estudados observamos que a prevalência de resistência dos isolados não mudou significativamente neste período para a maioria dos ATMs testados. Apesar da taxa de resistência a SXT ter diminuído significativamente, passando de 43% para 36%, ela ainda permanece muito elevada para permitir a inclusão deste antibiótico no tratamento empírico das ITUs na comunidade estudada. Houve também uma redução significativa da taxa de resistência à amicacina, entretanto, este antibiótico não é utilizado rotineiramente no tratamento de ITU-AC. Constatamos ainda que ocorreu uma mudança na prevalência de resistência à CF, que aumentou quase três vezes em relação ao período anterior estudado, passando de 13% para 33%. Este aumento no período de 2008 a 2009, alcançou taxas mais elevadas do que as descritas em outros estudos brasileiros, onde as estimativas variaram de 13 a 14% (KIFFER et al., 2007). Contudo é inferior a outros trabalhos que reportam taxas de resistência a CF entre 42 e 46% (CAMARGO et al., 2002; KOCK et al., 2008). É possível que a resistência à CF observada no nosso estudo reflita o amplo uso de cefalosporinas em outras infecções bacterianas, que não ITU, tais como, amigdalite, faringite, infecções respiratórias baixas, infecção de pele, tecidos moles, entre outras.

Na análise da distribuição clonal de cepas de *E. coli* isolados em ITU-AC foram identificados 31 grupos clonais distintos. Alguns clones (CgA, CgC e CgBT) predominaram entre os isolados considerados multidroga resistentes. Houve maior homogeneidade genética entre as cepas consideradas multidroga resistentes, apresentando resistência à classe dos β -lactâmicos (AMP, CF), das fluoroquinolonas (CIP) e das sulfas (SXT). É importante destacar que nossos isolados foram analisados por técnica amplamente utilizada (PFGE) nos diversos estudos realizados nesta linha de pesquisa (MANGES, et al., 2001; JOHNSON; RUSSO, 2005; TARTOF et al., 2005; MANGES, et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; MANGES et al., 2008; DIAS et al., 2009). Todas as amostras clonais do grupo CgA foram identificadas somente no segundo período do estudo (2008 a 2009), caracterizando portanto, o surgimento de um grupo clonal novo nesta comunidade. Estudos realizados nos EUA por Manges e colaboradores mostram a presença de clones definidos de *E. coli* causando ITU em mulheres jovens. Estes autores descreveram o predomínio de um grupo clonal designado CgA, apresentando altas taxas de resistência à SXT (50%). O aparecimento de cepas de *E. coli* uropatogênicas, pertencentes ao mesmo grupo clonal e associadas com resistência à SXT foi documentado também em outros estudos realizados nos EUA e Europa, bem como no Brasil (MANGES, et al., 2001; MANGES, et al., 2006; MANGES, et al., 2008; DIAS et al., 2009; SKJOT-RASMUSSEN et al., 2013). A presença de altas taxas de resistência à CIP entre os uropatógenos, exibindo fenótipo multidroga resistente (MDR) e a difusão mundial destes isolados, sugere a existência de propagação clonal, especialmente em *E. coli* causando ITU-AC.

Quanto à forma de aquisição e disseminação de resistência em isolados pertencendo ao mesmo grupo clonal, tem sido sugerido que os clones uropatogênicos são selecionados da própria microbiota fecal dos pacientes (TIBA, YANO E LEITE DDA, 2008). A fonte de disseminação ainda é pouco conhecida, porém existe a hipótese que estas cepas podem ser veiculadas através de água e alimentos contaminados, especialmente carne de aves. Mais recentemente, estudos realizados também nos EUA, Manges e colaboradores (2007), sugeriram que estes grupos clonais poderiam se disseminar através de uma fonte comum, possivelmente

alimentos. Adicionalmente, a presença destes grupos clonais nos afluentes de esgotos poderia funcionar como fonte de disseminação, conforme descreve Boczek e colaboradores (2007). A introdução na comunidade de alimentos contaminados por um único clone de *E. coli* resistente pode modificar de forma abrupta a prevalência de resistência de cepas de *E. coli* uropatogênicas na comunidade e se estender às infecções com maior gravidade (bacteremias).

Na Europa Skjøt-Rasmussen e colaboradores (2013) realizaram uma investigação em amostras pareadas de urina e sangue de pacientes hospitalizados e amostras de urina de pacientes com ITU-AC. Eles observaram a presença de grupos clonais, especialmente o CgA, com resistência à SXT (38%), de forma concomitante em alguns pacientes hospitalizados, confirmando a origem da infecção no trato urinário. Estes grupos clonais denominados CgA também foram encontrados nas amostras de urina da comunidade, apontando para a possibilidade de uma linhagem clonal secundária a uma fonte comum de *E. coli* ExPEC, causando não só ITU, como também infecção mais grave (bacteremia). Portanto, é imperativo limitar e controlar a utilização de antibióticos para evitar o surgimento de micro-organismos resistentes (RAMCHANDANI, et al., 2005; GIUFRE, et al., 2012).

No Brasil, na cidade do Rio de Janeiro, Dias e colaboradores (2009), descreveram pela primeira vez a presença do grupo CgA em isolados de *E. coli* procedentes de pacientes com ITU-AC na América Latina. Eles reportaram a presença de quatro grupos clonais em 43% das amostras. Os autores sugerem que o encontro de um grupo com padrões idênticos, pode ser associado à presença de um ancestral comum fazendo parte da própria microbiota intestinal dos pacientes, mesmo antes da aquisição da infecção e uso de antibióticos.

Embora a grande maioria das publicações descreva a presença de um clone predominante e, possivelmente endêmico, associado à presença de altas taxas de resistência aos ATMs (em especial a SXT e a CIP) em uropatógenos isolados de ITU-AC, estes trabalhos não são todos concordantes. Alguns autores não apontam a expansão clonal como um fator determinante no aumento ou diminuição da prevalência de resistência aos ATMs entre os isolados de *E. coli* na comunidade

(FRANCE et al., 2005; SOLBERG; AJIBOYE; RILEY, 2006; UCHIDA et al., 2010). No nosso estudo houve homogeneidade genética entre as cepas da *E. coli* apresentando resistência múltipla aos ATMs. É sabido que a resistência a ATMs é um processo resultante da pressão da seleção do uso de ATMs (WRIGHT. 2003; HOTOON, et al.,2004, FURUYA;LOWY,2006). Nossos resultados sugerem que a pressão seletiva que gerou a resistência seria associada ao uso amplo e contínuo de ATMs, o que não ocorre no uso humano na comunidade, em geral, disperso e descontínuo. Adicionalmente, para que a resistência aumente e se dissemine em determinados ambientes, é necessário que ela traga vantagem ou favorecimento para as cepas resistentes.

Em hospitais, a presença de pacientes colonizados e o uso amplo e contínuo de ATMs permitem que a pressão seletiva favoreça a emergência e, sobretudo, a disseminação de cepas resistentes. Nesta situação, clones homogêneos de micro-organismos são selecionados devido à vantagem biológica de apresentarem resistência. Na comunidade, o uso humano de antibióticos ocorre de maneira mais dispersa e descontínua, não sendo, geralmente, suficiente para produzir o mesmo tipo de pressão seletiva como acontece no uso hospitalar (KUNIN; LIU, 2002; SANTOS, 2004; SOTO, 2009). Assim, o esperado é o surgimento de maior diversidade clonal entre os micro-organismos resistentes, portanto, resultando em maior heterogeneidade genética.

Na atividade agro-veterinária, o uso de ATMs é realizado de maneira continuada, ostensiva e indiscriminada, além de ocorrer em ambientes circunscritos, a exemplo dos criatórios de aves e suínos. Nestes locais, a ração e a água fornecida aos animais são acrescidas de ATMs de várias classes como: CIP, β -lactâmicos, colistinas, sulfas, lincosamidas e macrolídeos, entre outros de uso comum também na medicina humana (PHILLIPS et al., 2004; COLLIGNON et al., 2009). Esta prática poderia selecionar grupos clonais entre os micro-organismos que colonizam frangos e suínos. Os alimentos assim produzidos são distribuídos amplamente, alguns criatórios suprem comunidades inteiras, alcançando várias cidades diferentes e até outros países. A introdução dessas cepas na comunidade humana se daria por via oral, através do consumo da carne comercializada no varejo. Se os produtos alimentares

de origem animal servirem de reservatório para cepas de ExPEC com resistência bacteriana, o consumo destes produtos pelo homem, possibilitaria a colonização do trato gastrointestinal por estas cepas consideradas os principais agentes etiológicos das ITUs. Isto poderia representar a fonte de disseminação comunitária de clones selecionados através da pressão seletiva do uso agroveterinário de ATMs.

A possível ligação entre *E. coli* Expec causando infecção humana e a *E. coli* encontrada nos derivados de carnes, especialmente de frango, é apoiada pela compatibilidade de padrões de resistência aos ATMs e/ou genes de resistência de *E. coli* presentes nestas fontes (SKYBERG et al., 2006). Estudos realizados nos EUA reportam a identificação de *E. coli* isoladas em alimentos distribuídos na comunidade, apresentando características genéticas indistinguíveis ou relacionadas às *E. coli* isoladas em ITUs de pacientes com ITU-AC. Diante destes achados, os autores levantam a hipótese que a carne vendida no varejo, pode servir de reservatório para cepas de *E. coli*, principal agente etiológico das infecções extra-intestinais humanas. (MANGES, et al., 2001; RAMCHANDANI et al., 2005; MANGES et al., 2008; SONDERHOLM, 2008; VINCENT et al., 2010; SKJOT-RASMUSSEN et al., 2013).

É importante analisar a distribuição dos clones e os mecanismos de disseminação da resistência aos ATMs entre as *E. coli* uropatogênicas (UPEC) na comunidade. Dados publicados sugerem que estes grupos clonais estão circulando nos seres humanos, provavelmente, como parte do reservatório intestinal, podendo contribuir para uma fração considerável de resistência nas ITU-AC. São necessários mais estudos para indicar as origens, os mecanismos de virulência, a distribuição geográfica, o impacto clínico e os modos de disseminação do grupo clonal CgA.

7.0 – MÉRITOS E LIMITAÇÕES

Entre os méritos do presente trabalho, destacamos a seleção criteriosa e representativa de pacientes com ITU-AC, minimizando a possibilidade de inclusão inadvertida de casos de ITU nosocomial. Além disso, nosso estudo incluiu uma amostra grande de pacientes ambulatoriais procedentes de serviços diferentes (público e privado) em dois períodos distintos, abrangendo um intervalo de oito anos.

A ausência de informações clínicas detalhadas é uma das limitações, impossibilitando a avaliação de possíveis rotas de transmissão de *E. coli* nas infecções comunitárias, além de não permitir determinar fatores de risco para infecção na comunidade por cepas com características genotípicas indistinguíveis.

8.0 – CONCLUSÕES

1 – A alta prevalência de resistência a antimicrobianos comumente usados (SXT, CIP e AMP) nas cepas de *E. coli* causando ITU-AC contra indica a utilização destas drogas no tratamento empírico destas infecções.

2 – A taxa de resistência a CIP nos isolados de *E. coli* das ITU-AC foi relativamente alta em comparação com as estimativas globais. Portanto, é necessário monitorar as taxas de resistência às fluoroquinolonas na nossa comunidade, já que a disseminação da resistência a esta classe de ATMs teria um impacto no custo e tornaria mais difícil o tratamento empírico das ITU-AC.

3 – Não houve mudanças significativas, do ponto de vista clínico, nas taxas de resistência das cepas de *E. coli* causando ITU-AC na população estudada no período de oito anos avaliados.

4 – O clone CgA predominou entre os isolados de *E. coli* apresentando multidroga resistência nas ITU-AC. Este grupo clonal só foi detectado no final do período de estudo, portanto, parece ter sido introduzido mais recentemente na nossa comunidade.

5 – A diversidade clonal diminuiu nos isolados com maior prevalência de resistência, sugerindo ser resultado de pressão seletiva pelo uso amplo e indiscriminado de ATMs, como ocorre no uso humano intra-hospitalar e no uso agro-veterinário.

6 – Adicionalmente, a maioria das *E. coli* multiresistentes pertencia a um único grupo clonal (CgA), consistente com a possibilidade de disseminação da resistência em ITU-AC através de um reservatório comum como fontes alimentares, conforme sugerido em outros estudos. Alguns alimentos (carne de frango e porcos) estão sujeitos à pressão seletiva do uso agro-veterinário de ATMs e podem ser fonte de cepas resistentes com potencial de causar doença em humanos na comunidade.

7 – Novos estudos de vigilância devem ser realizados para caracterização genética de cepas de *E. coli* isoladas de pacientes da comunidade e de fontes alimentares, a fim de testar se a resistência bacteriana na comunidade pode ser resultado da introdução de grupos clonais selecionados pelo uso agro-veterinário. Estas fontes são importantes pelo elevado potencial de disseminação da resistência bacteriana na população.

9.0 – REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Principais Síndromes Infecciosas – Módulo 1**. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_1_2004.pdf> Acesso em: 22 dez. 2012.

AARESTRUP, F. M.; WEGENES, H. C. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 8, p. 639-644, 1999.

ABODERIN, O. A. et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains from urinary tract infections. **J Natl Med Assoc**, v. 101, n. 12, Dec, p. 1268-1273, 2009.

AGARWAL, J.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. **Indian J Med Microbiol**, v. 30, n. 2, Apr-Jun, p. 141-149, 2012.

AHMED, N. et al. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: Applications in diagnostics, epidemiology and intervention. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 5, May, p. 387-394, 2008.

AKRAM, M.; SHAHID, M.; KHAN, A. U. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 6, n.4, p. 4, 2007.

ALOS, J. I. et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 3, Mar, p. 199-203, 2005.

ANDRADE, S. S. et al. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: Time for local guidelines? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, Nov, p. 741-748, 2006.

ANNA F`ABREGA et al. Quinolone resistance in the food chain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 4, p. 307-315, 2008.

ARSLAN, H. et al. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 5, Nov, p. 914-918, 2005.

BARTOLONI, A. et al. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. **J Infect Dis**, v. 189, n. 7, Apr 1, p. 1291-1294, 2004.

BÉLANGER, L. et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2011.

BENDER, J. B. et al. Surveillance by molecular subtype for *Escherichia coli* 0157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. **N Engl J Med**, v. 337, n. 6, Aug 7, p. 388-394, 1997.

BENGTSSON, C. et al. Bacteriuria in a population sample of women: 24-year follow-up study. Results from the prospective population-based study of women in Gothenburg, Sweden. **Scand J Urol Nephrol**, v. 32, n. 4, Jul, p. 284-289, 1998.

BERGERON, C. R. et al. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 415-421, 2012.

BOCZEK, L. A. et al. Occurrence of antibiotic-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clonal group a in wastewater effluents. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 13, Jul, p. 4180-4184, 2007.

BRAUNER, A.; CHROMEK, M. A. Urinary tract infection. Why do some children get complications, while others don't? **Current Pediatric Reviews**, v. 3, n.1, p. 35-44, 2007.

BYARUGABA, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **Int J Antimicrob Agents**, v. 24, n. 2, Aug, p. 105-110, 2004.

CAMARGO, C. B. S. D. et al. Infecções de vias urinárias na comunidade de Ribeirão Preto-SP: Etiologia, sensibilidade bacteriana a antimicrobianos e implicações terapêuticas. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 35, n.2, p. 173-178, 2002.

CAO, X. et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections in 20 Chinese hospitals. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 7, Jul, p. 2496-2501, 2011.

CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infect Genet Evol**, v. 11, n. 3, Apr, p. 654-662, 2011

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Documento: M100-S11, Janeiro de 2001.

_____. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Documento: M100-S12, Janeiro de 2002.

_____. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Documento: M100-S18, Janeiro de 2008.

_____. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Documento: M100-S19, Janeiro de 2009.

COLGAN, R. et al. Risk factors for trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in patients with acute uncomplicated cystitis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 3, Mar, p. 846-851, 2008.

COLLIGNON, P. Resistant *Escherichia coli*--we are what we eat. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 2, Jul 15, p. 202-204, 2009.

COLLIGNON, P. et al. World health organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 1, Jul 1, p. 132-141, 2009.

COSTA, A. R. F. D. et al. Desenvolvimento de pcr multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 2, p. 77-84, 2010.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 1, Jan, p. 26-38, 2010.

CZAJA, C. A. et al. Population-based epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. **Clin Infect Dis**, v. 45, n. 3, Aug 1, p. 273-280, 2007.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex pcr assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, Mar, p. 490-495, 2010.

DE BACKER D et al. Evolution of bacterial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in uncomplicated urinary tract infections in a country with high antibiotic consumption: A comparison of two surveys with a 10 year interval. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. 364-368, 2008.

DEZFULIAN, H. et al. Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in f165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 4, Apr, p. 1375-1385, 2003.

DIAS, R. C. et al. Clonal composition of *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 15, n. 4, Dec, p. 303-308, 2009.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* o157:H7 and its significance in foods. **Int J Food Microbiol**, v. 12, n. 4, Apr, p. 289-301, 1991.

DREWS, S. J. et al. Decreased prevalence of virulence factors among ciprofloxacin-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, Aug, p. 4218-4220, 2005.

DROMIGNY, J. A. et al. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Dakar, Senegal. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 1, Jul, p. 236-239, 2005.

DURIEZ, P. et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 6, Jun, p. 1671-1676, 2001.

DYER, I. E.; SANKARY, T. M.; DAWSON, J. A. Antibiotic resistance in bacterial urinary tract infections, 1991 to 1997. **West J Med**, v. 169, n. 5, Nov, p. 265-268, 1998.

ECHOLS, R. M. et al. Demographic, clinical, and treatment parameters influencing the outcome of acute cystitis. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 1, Jul, p. 113-119, 1999.

EJRNAES, K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Dan Med Bull**, v. 58, n. 4, Apr, p. 2011.

ENNE, V. I. et al. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the uk despite national prescribing restriction. **Lancet**, v. 357, n. 9265, Apr 28, p. 1325-1328, 2001.

FOXMAN, B. Contributions of molecular epidemiology to the understanding of infectious disease transmission, pathogenesis, and evolution. **Ann Epidemiol**, v. 17, n. 2, Feb, p. 148-156, 2007.

_____. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. **Am J Med**, v. 113 Suppl 1A, n., Jul 8, p. 5S-13S, 2002.

FOXMAN, B. et al. Urinary tract infection: Self-reported incidence and associated costs. **Ann Epidemiol**, v. 10, n. 8, Nov, p. 509-515, 2000.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: Focus on infection. **Am J Epidemiol**, v. 153, n. 12, Jun 15, p. 1135-1141, 2001.

FRANCE, A. M. et al. Clonal groups and the spread of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in uropathogenic *Escherichia coli*. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 8, Apr 15, p. 1101-1107, 2005.

FRIEDMAN, S. et al. Clinical and laboratory characteristics of non- *E. coli* urinary tract infections. **Arch Dis Child**, v. 91, n. 10, Oct, p. 845-846, 2006.

FURUYA, E. Y.; LOWY, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 1, Jan, p. 36-45, 2006.

GIUFRE, M. et al. *Escherichia coli* of human and avian origin: Detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 4, Apr, p. 860-867, 2012.

GOVERNADO, M. et al. Antimicrobial susceptibility of clinical *Escherichia coli* isolates from uncomplicated cystitis in women over a 1-year period in Spain. **Rev Esp Quimioter**, v. 20, n. 1, Mar, p. 68-76, 2007a.

_____. Quinolone resistance in female outpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: Age-related differences. **Rev Esp Quimioter**, v. 20, n. 2, Jun, p. 206-210, 2007b.

GOETTSCHE, W. et al. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, n. 2, Aug, p. 223-228, 2000.

E. B. M.; TOPOROVSKI, J. Infecção urinária na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n., p. 165-169, 2001.

GUPTA, K. Addressing antibiotic resistance. **Am J Med**, v. 113 Suppl 1A, n., Jul 8, p. 29S-34S, 2002.

GUPTA, K. et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. **Clin Infect Dis**, v. 52, n. 5, Mar 1, p. e103-120, 2011.

GUPTA, K.; HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. **Ann Intern Med**, v. 135, n. 1, Jul 3, p. 41-50, 2001.

_____. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. **Annals of Internal Medicine**, v. 135, n. 1, p. 41 - 50, 2001.

GUPTA, V.; YADAV, A.; JOSHI, R. M. Antibiotic resistance pattern in uropathogens. **Indian J Med Microbiol**, v. 20, n. 2, Apr-Jun, p. 96-98, 2002.

GUYER, D. M. et al. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 38, n. 1, Oct, p. 53-66, 2000.

HOBBERMAN, A. et al. Prevalence of urinary tract infection in febrile infants. **J Pediatr**, v. 123, n. 1, Jul, p. 17-23, 1993.

HOOTON, T. M. Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. **N Engl J Med**, v. 366, n. 11, Mar 15, p. 1028-1037, 2012.

_____. Pathogenesis of urinary tract infections: An update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. suppl 1, August 1, 2000, p. 1-7, 2000.

HOOTON, T. M. et al. Acute uncomplicated cystitis in an era of increasing antibiotic resistance: A proposed approach to empirical therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, July 1, 2004, p. 75-80, 2004.

HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infect Dis Clin North Am**, v. 11, n. 3, Sep, p. 551-581, 1997.

HOPKINS, K. L.; DAVIES, R. H.; THRELFALL, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 358-373, 2005.

JAMES, P. N. J., B.K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. Clonal origin, virulence factors, and virulence. **Infect Immun**, v. 68, n. 1, Jan, p. 424-425, 2000.

JOHNSON, J. R. et al. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. **J Infect Dis**, v. 191, n. 7, Apr 1, p. 1040-1049, 2005.

_____. A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis. **Lancet**, v. 359, n. 9325, Jun 29, p. 2249-2251, 2002.

_____. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Echerichia coli* in retail foods. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 7, p. 1040-1049, 2005.

_____. Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 1, Jan, p. 141-145, 2005.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". **Journal Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 3, p. 135-143, 2002.

_____. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (Uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol**, v. 295, n. 6-7, Oct, p. 383-404, 2005.

_____. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. **J Infect Dis**, v. 186, n. 6, Sep 15, p. 859-864, 2002.

KAHLMETER, G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in Europe. The ECO SENS STUDY. **Int J Antimicrob Agents**, v. 22 Suppl 2, Oct, p. 49-52, 2003.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, Feb, p. 123-140. 2004.

KARLOWSKY, J. A. et al. Trends in antimicrobial susceptibilities among Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in the United States from 1998 to 2001. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 5, May, p. 1672-1680, 2003.

_____. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, Aug, p. 2540-2545, 2002.

KATOULI, M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. **Iran J Microbiol**, v. 2, n. 2, Jun, p. 59-72, 2010.

KEAH, S. H. Antimicrobial susceptibility of community-acquired uropathogens in general practice. **Malasian Family Physician**, v. 2, n.2, p. 64-68, 2007.

KIFFER, C. R. et al. Antibiotic resistance and trend of urinary pathogens in general outpatients from a major urban city. **Int Braz J Urol**, v. 33, n.1,p. 42-48,2007.

KOCK, R. C. et al. Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 277-281, 2008.

KOTHARI, A.; SAGAR, V. Antibiotic resistance in pathogens causing community-acquired urinary tract infections in India: A multicenter study. **J Infect Dev Ctries**, v. 2, n. 5, p. 354-358, 2008.

KUCHERIA, R. et al. Urinary tract infections: New insights into a common problem. **Postgrad Med J**, v. 81, n. 952, Feb, p. 83-86, 2005.

KUNIN, C. M.; LIU, Y. C. Excessive use of antibiotics in the community associated with delayed admission and masked diagnosis of infectious diseases. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 35, n. 3, Sep, p. 141-146, 2002.

LAPCHIK, M. S. Tratamento da infecção urinária não complicada (itu): Estudo comparativo entre a ciprofloxacina (cipro) e sulfametoxazol + trimetoprima (szm+tmp) com 2 esquemas de duração terapêutica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 17, n.1, p. 31-34, 1995.

LIPSKY, B. A. Urinary tract infections in men. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Ann Intern Med**, v. 110, n. 2, Jan 15, p. 138-150, 1989.

LOBEL, B. et al. Comparison of antimicrobial susceptibility of 1,217 *Escherichia coli* isolates from women with hospital and community-acquired urinary tract infections. **Presse Med**, v. 37, n. 5 Pt 1, May, p. 746-750, 2008.

LOGUE, C. M. et al. Genotypic and phenotypic traits that distinguish neonatal meningitis-associated *Escherichia coli* from fecal *E. coli* isolates of healthy human hosts. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 16, Aug, p. 5824-5830, 2012.

MACDOUGALL, C. et al. Hospital and community fluoroquinolone use and resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in 17 US hospitals. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 4, Aug 15, p. 435-440, 2005.

MANGES, A. R., ET AL. The changing prevalence of drug-resistant *Escherichia coli* clonal groups in a community: Evidence for community outbreaks of urinary tract infections. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 02, p.425-431, 2006.

_____. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multi-drug resistant *Escherichia coli* clonal group. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 14, p. 1007, 2001.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 5, Sep, p. 712-719, 2012.

MANGES, A. R. et al. Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 10, Oct, p. 1575-1583, 2008.

MANIKANDAN, S. et al. Antimicrobial susceptibility pattern of urinary tract infection causing human pathogenic bacteria. **Asian Journal of Medical Sciences**_v. 3, n. 2, p. 56-60, 2011.

MARILD, S.; JODAL, U. Incidence rate of first-time symptomatic urinary tract infection in children under 6 years of age. **Acta Paediatr**, v. 87, n. 5, May, p. 549-552, 1998.

MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin Infect Dis**, v. 17, n. 2, Aug, p. 153-162; quiz 163-154, 1993.

MELLATA, M. et al. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, Jan, p. 536-540, 2003.

MELLON, M.; BENBROOK, C.; BENBROOK, K. L. Estimates of antimicrobial abuse in Livestock. **UCS Publications**, 2001.

MOREIRA, E. D., JR. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains causing community-acquired urinary tract infections among insured and uninsured populations in a large urban center. **J Chemother**, v. 18, n. 3, Jun, p. 255-260, 2006.

MOURA, A. et al. Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated uti:Difficult relationships **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1779–1791, 2009.

MURRAY, B. E. Problems and dilemmas of antimicrobial resistance. **Pharmacotherapy**, v. 12, n. 6 Pt 2, p. 86S-93S, 1992.

MUTNICK, A. H. et al. Antimicrobial usage and resistance trend relationships from the mystic programme in North America (1999-2001). **J Antimicrob Chemother**, v. 53, n. 2, Feb, p. 290-296, 2004.

NARCISO, A. et al. *Escherichia coli* uropatogénica: Resistência aos antibióticos versus factores de virulência. **Acta Urol**, v. 27, n. 2, p. 11-20, 2010.

NICOLLE, L. et al. Uncomplicated urinary tract infection in women. Current practice and the effect of antibiotic resistance on empiric treatment. **Can Fam Physician**, v. 52, n., May, p. 612-618, 2006.

NICOLLE, L. E. Asymptomatic bacteriuria: When to screen and when to treat. **Infect Dis Clin North Am**, v. 17, n. 2, Jun, p. 367-394, 2003.

OKEKE, I. N.; EDELMAN, R. Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n., p. 364-369, 2001.

OLESEN, B. et al. Cluster of multiresistant *Escherichia coli* o78:H10 in greater copenhagen. **Scand J Infect Dis**, v. 26, n. 4, p. 406-410. 1994.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**, São Paulo: Savier, 2004.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **Am J Med**, v. 119, n. 6 Suppl 1, Jun, p. S20-28; discussion S62-70, 2006.

PEIGNE, C. et al. The plasmid of *Escherichia coli* strain s88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. **Infect Immun**, v. 77, n. 6, Jun, p. 2272-2284, 2009.

PHILLIPS, I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J Antimicrob Chemother**, v. 53, n. 1, Jan, p. 28-52, 2004.

_____. Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in west lambeth health district. **Lancet**, v. 331, n. 8593, p. 1038-1041, 1988.

PIRES, M. C. S. Prevalência e susceptibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário em Hospital universitário de Brasília, no período de

2001-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n., p. 643-647, 2007.

PITOUT, J. D. et al. Community-wide outbreaks of clonally related ctx-m-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the calgary health region. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, Jun, p. 2844-2849, 2005.

PRATS, G. et al. *Escherichia coli* serotype o15:K52:H1 as a uropathogenic clone. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 1, Jan, p. 201-209, 2000.

RAGNARSDOTTIR, B. et al. Tlr- and cxcr1-dependent innate immunity: Insights into the genetics of urinary tract infections. **Eur J Clin Invest**, v. 38 Suppl 2, n., Oct, p. 12-20, 2008.

RAMA, G. et al. Urinary tract infections - microbial virulence determinants and reactive oxygen species. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n.5, p. 339-349, 2005.

RAMCHANDANI, M. et al. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 2, Jan 15, p. 251-257, 2005.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E. et al. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 6, Jun, p. 2097-2110, 2005.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 449-456, 2003.

SANTOS, A. C. D. M. et al. A virulência de *Escherichia coli* extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **Mundo Saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, p. 64-70. 2004.

SAURINA, G. et al. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: Epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. **J Antimicrob Chemother**, v. 45, n. 6, Jun, p. 895-898, 2000.

SCHROEDER, C. M. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 2, Feb, p. 576-581, 2002.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of afa/dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, Apr, p. 264-292, 2005.

SILVA, E. A. Infecções urinárias de origem bacteriana diagnosticadas em Umuarama-PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.1, p. 59-61, 2007.

SKJOT-RASMUSSEN, L. et al. *Escherichia coli* clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 7, Jul, p. 656-661, 2013.

SKYBERG, J. A. et al. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, Nov, p. 6287-6292, 2006.

SMITH, J. R.; FRATAMICO, P. N.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

SOARES, L. A.; NISHI, C. Y. M.; WAGNER, H. L. Isolamento das bactérias causadoras de infecções urinárias e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 2, n.6, p. 84-92, 2006.

SOLBERG, O. D.; AJIBOYE, R. M.; RILEY, L. W. Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, Apr, p. 1347-1351, 2006.

SONDERHOLM, J. Use of antibiotics in food animals. **The organization Keep Antibiotics Working**, p. 1-15. 2008.

SOTO, M. S. Relationship between virulence and antimicrobial resistance in bacterial. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 20, n.2, p. 84-90, 2009.

STAMM, W. E.; THEODORE E. Woodward award: Host-pathogen interactions in community-acquired urinary tract infections. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 117, n., p. 75-83; discussion 83-74, 2006.

TARTOF, S. Y. et al. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 12, Dec, p. 5860-5864, 2005.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Med**, v. 119, n. 6 Suppl 1, Jun, p. S3-10; discussion S62-70, 2006.

TENOVER, F. C., ET AL. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p.2233-2239, 1995.

TIBA, M. R.; YANO, T.; LEITE DDA, S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 5, Sep-Oct, p. 255-260, 2008.

UCHIDA, Y. et al. Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in asia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 387-391, 2010

VAN BELKUM, A. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, n., p. 1-46, 2007.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Int J Antimicrob Agents**, v. 14, n. 4, May, p. 327-335, 2000.

VINCENT, C. et al. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 1, Jan, p. 88-95, 2010

VOETS, G. M. et al. Population distribution of beta-lactamase conferring resistance to third-generation cephalosporins in human clinical Enterobacteriaceae in the Netherlands. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52102, 2012.

WAGENLEHNER, F.; HOYME, U.; NABER, K. Therapy of the acute uncomplicated urinary tract infection. **Urologe A**, v. 45, n. 4, Apr, p. 429-432, 434-425, 2006.

WANKE, C. A. Pathogenic *Escherichia coli*. **Uptodate**. Disponível em< <http://www.uptodate.com/contents/pathogenic-Escherichia-coli>> Acesso em: abril 2012.

WARREN, J. W. et al. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 4, Oct, p. 745-758, 1999.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp Mol Pathol**, v. 85, n. 1, Aug, p. 11-19, 2008.

WILLIAMS, G. J. Absolute and relative accuracy of rapid urine tests for urinary tract infection in children: A meta-analysis. **Lancet Infection Disease**, v. 10, n., p. 240-250, 2010.

WRIGHT, G. D. Mechanisms of resistance to antibiotics. **Curr Opin Chem Biol**, v. 7, n. 5, Oct, p. 563-569, 2003.

WRIGHT, K. J.; SEED, P. C.; HULTGREN, S. J. Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 73, n. 11, p. 7657-7668, 2005.

ZHANEL, G. G. et al. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: Final results from the North American urinary tract infection collaborative alliance (nautica). **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, n. 6, Jun, p. 468-475, 2006.

_____. A Canadian National Surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: Comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. The Canadian urinary isolate study group. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 4, Apr, p. 1089-1092, 2000.

ZHANG, L.; FOXMAN, B.; MARRS, C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 11, Nov, p. 3951-3955, 2002.