



FIOCRUZ

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

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Distribuição clonal de cepas de *Escherichia coli* isoladas em infecções
do trato urinário adquiridas na comunidade**

JOILTON OLIVEIRA MATOS

**Salvador - Bahia – Brasil
2010**

Joilton Oliveira Matos

Distribuição clonal de cepas de *Escherichia coli*
isoladas em infecções do trato urinário
adquiridas na comunidade

Dissertação de mestrado submetida a Coordenação do curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa da Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, sob orientação de Dr. Edson Duarte Moreira Jr.

Salvador – BA

2010

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

Matos, Joilton Oliveira

M433d Distribuição clonal de cepas de *Escherichia coli* isoladas em infecções do trato urinário adquiridas na comunidade. [manuscrito] / Joilton Oliveira Matos. - 2010. 48 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Mestrado (dissertação) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Edson Duarte Moreira Jr., Laboratório de Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística.

1. Trato Urinário. 2. *Escherichia coli*. 3. Resistência Bacteriana. 4. Disseminação Clonal, I.Título.

CDU 616.62:616.995.132

A Deus nosso Pai Maior de infinita bondade e sabedoria que através de sua lei manifesta sua justiça e amor para o crescimento de nossas vidas dando-nos a oportunidade de crescer em ciência em moral visando incansavelmente o progresso da humanidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por todo amor, incentivo e apoio incondicional durante toda a vida.

A Corine, pelo amor, paciência, companheirismo e cumplicidade... Amo-te!

Ao meu conspícuo orientador Dr. Edson Duarte pela oportunidade, confiança, paciência e dedicação durante todo o período do mestrado e por me ensinar tanto coisas da ciência quanto da vida.

A Raimundo (Rai) pela paciência e apoio indispensável na elaboração desse trabalho.

A Dr^a Joice Reis Pedreira Neves pela confiança, orientação e oportunidades concedidas.

A Soraia que sempre com bom humor e paciência me ajudou e orientou durante os experimentos.

A Milena, Ana Paula (Paulinha) e Jailton pelo companheirismo e ajuda durante os experimentos. Sou grato, de coração, por tudo.

A todos os amigos do LEMB que recentemente conquistei... Pricila, Zaira, Fred, Tatiane, Conceição, Aldo, Simone e Cristiane.

A Goreth pela sua amizade, apoio e incentivo.

Distribuição clonal de cepas de *Escherichia coli* isoladas em infecções do trato urinário adquiridas na comunidade

Joilton Oliveira Matos

Orientador: Dr. Edson Duarte Moreira Jr.

Introdução: A infecção do trato urinário adquirida na comunidade (ITU-AC) situa-se entre as mais freqüentes infecções bacterianas do ser humano e uma das principais razões para o uso de antibióticos. A *Escherichia coli* causa aproximadamente 80% destas infecções. Estudos recentes sugerem que as mudanças na prevalência da resistência aos antimicrobianos entre os isolados de *E. coli* na comunidade são mais influenciados pelo aparecimento e desaparecimento transitório de grupos clonais do que pela pressão seletiva exercida com o uso indiscriminado de determinados antimicrobianos. **Objetivos:** Avaliar a clonalidade das cepas de *E. coli* isoladas em ITU-AC, investigando o papel da clonalidade destas cepas na persistência e disseminação da resistência à ciprofloxacina. **Material e Métodos:** Das 463 cepas de *E. coli* isoladas consecutivamente de pacientes com ITU-AC atendidos em dois serviços ambulatoriais em Salvador/BA no período de 2001 a 2002, foi selecionada uma amostra de cepas resistentes à Ciprofloxacina (n=45) e outra de cepas sensíveis a todos os antimicrobianos testados (n=43). Os testes de susceptibilidade foram realizados conforme recomenda o *Clinical and Laboratory Standards Institute* e a clonalidade das cepas foi analisada através da comparação dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), utilizando os critérios de Tenover como estabelecido pelo *Centers for Disease Control and Prevention*. **Resultado:** Os principais grupos clonais entre as cepas resistentes à ciprofloxacina foram G, A e D que corresponderam a 42% destas e apenas a 7% das cepas sensíveis ($p < 0,001$). **Conclusão:** Nossos dados mostram a predominância de alguns grupos clonais entre os isolados de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina. Sugerindo, portanto, que a expansão de determinados clones pode desempenhar papel importante na disseminação de resistência bacteriana em ITUs-AC.

Clonal distribution of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections

Joilton Oliveira Matos

Orientador: Dr. Edson Duarte Moreira Jr.

Introduction: Community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) is among the most frequent bacterial infections in humans and a major reason for antibiotic use. *Escherichia coli* causes approximately 80% of these infections. Recent studies suggest that changes in the prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *E. coli* in the community are more influenced by appearance and disappearance of transient clonal groups than by selective pressure from indiscriminate use of certain antimicrobials. **Objectives:** To evaluate the clonality of strains of *E. coli* isolated from CA-UTI, investigating the role of clonality of these strains in the persistence and spread of resistance to ciprofloxacin. **Methods:** Of 463 strains of *E. coli* isolated consecutively from patients with CA-UTI treated at two outpatient services in Salvador, Bahia from 2001 to 2002, we selected a sample of strains resistant to ciprofloxacin (n = 45) and another sample of strains susceptible to all antimicrobials tested (n = 43). The susceptibility tests were performed as recommended by the *Clinical and Laboratory Standards Institute* and clonality of the strains was analyzed by comparing the electrophoresis patterns of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the criteria of Tenover as established by Centers for Disease Control and Prevention. **Results:** The main clonal groups of strains resistant to ciprofloxacin were G, A and D which accounted for 42% of them and comprised only 7% of susceptible strains (p <0.001). **Conclusion:** Our data show the predominance of some clonal groups among isolates of *E. coli* resistant to ciprofloxacin. Thus suggesting that the expansion of certain clones may play an important role in the spread of bacterial resistance in CA-UTI.

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO.....	04
1.1 - Infecção do Trato Urinário (ITU).....	04
1.1.1 – Definição.....	04
1.1.2 – Epidemiologia.....	05
1.1.3 – Etiologia.....	06
1.1.4 – Diagnóstico Microbiológico.....	06
1.1.5 – Tratamento.....	07
1.2 – Resistência aos Antimicrobianos.....	08
1.3 – Causas e Mecanismos de Aquisição e Disseminação da resistência.....	10
1.4 – A Biologia Molecular na Investigação Epidemiológica.....	12
1.5 – Transmissão e Disseminação Clonal.....	15
2.0 – OBJETIVOS.....	18
2.1 – Objetivo Geral.....	18
2.2 – Objetivos Específicos.....	18
3.0 – MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 – Locais do estudo.....	19
3.2 – População.....	19
3.2.1 – Critérios de Inclusão.....	19
3.2.2 – Critérios de Exclusão.....	19
3.3 – Desenho do Estudo.....	19
3.4 – Coleta de Dados.....	20
3.5 – Isolamento de <i>E. coli</i>	20
3.6 – Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos.....	20
3.7 – Genotipagem por Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	21
3.8 – Análise Estatística.....	22
3.9 – Considerações Éticas.....	23
4.0 – RESULTADOS.....	24
5.0 – DISCUSSÃO.....	34

6.0 - CONCLUSÕES.....	39
7.0 - LIMITAÇÕES E MÉRITOS.....	41
8.0 – REFERÊNCIAS.....	42

1.0 - INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos tem sido considerada 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 (CDC, 2009). A resistência aos antibióticos constitui uma ameaça direta a saúde humana, diminuindo a eficácia dos tratamentos, prolongando as doenças e aumentando o risco de morbidades mais graves (FOXMAN, 2007).

Ao analisar o aumento da resistência entre as bactérias isoladas de infecções em humanos, é conveniente considerar o hospital e a comunidade como ecossistemas distintos. Apesar de arbitrária, esta divisão reflete diferentes populações, pressões seletivas, reservatórios e outros fatores que são importantes no surgimento, persistência e transmissão da resistência entre estes microorganismos (COHEN, 1992).

A infecção do trato urinário é uma das indicações mais comuns para o tratamento com antimicrobianos. O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos utilizados como primeira escolha tem limitado as opções terapêuticas para o tratamento dessas infecções tanto em âmbito hospitalar como na comunidade.

1.1 - Infecção do Trato Urinário (ITU)

1.1.1 - Definição

A ITU pode ser definida como a invasão e multiplicação de microorganismos nos tecidos do trato urinário, desde a uretra até os rins (THOMPSON et al, 2003). A ITU pode ser classificada como complicada ou não complicada. A ITU não complicada refere-se a

episódios de cistite ou pielonefrite que ocorrem em indivíduos jovens, previamente saudáveis e sem qualquer anormalidade anatômica ou funcional do trato urinário. A ITU complicada, por outro lado, esta associada a condições que aumentam o risco de complicações graves ou falha do tratamento, tais como: Diabetes, bexiga neurogênica ou nefrolitíase (HOOTON, 1997).

1.1.2 - *Epidemiologia*

As ITUs estão entre as mais freqüentes infecções que ocorrem em mulheres. Aproximadamente, 10% das mulheres adultas apresentam um episódio de infecção urinária por ano na comunidade e 50% tem ao menos um evento durante a vida. A maior incidência de ITU acontece em mulheres jovens, sexualmente ativas, com faixa etária entre 18 e 24 anos, sendo as recidivas particularmente comuns (cerca de 5%) (FOXMAN et al, 2000). As ITUs raramente acontecem em homens jovens com trato geniturinário normal, porém existem alguns fatores de riscos que estão relacionados com o aumento da incidência no sexo masculino, como relações homossexuais e parceiras sexuais com colonização vaginal por *Escherichia coli* (FOXMAN et al, 2002b). Após 60 anos de idade, a incidência de ITU aumenta, podendo atingir cerca de 3 a 4% dos homens, relacionando-se a quadros de hiperplasia prostática (NABER et al, 2006).

Em 1995, foi estimado que nos Estados Unidos as infecções do trato urinário adquiridas na comunidade (ITU-AC) resultaram em aproximadamente oito milhões de visitas médicas e mais de cem mil admissões hospitalares, com custos aproximados de 1,6 bilhões de dólares (FOXMAN et al, 2002^a). Os custos diretos incluem os implicados no atendimento ambulatorial, despesas com a terapia antimicrobiana e hospitalização, enquanto os custos indiretos são relacionados à perda de produção por dias não trabalhados (FOXMAN et al, 2000; FOXMAN et al, 2002a).

1.1.3 – Etiologia

Muitos microrganismos podem infectar o trato urinário, mas os agentes etiológicos predominantes são os bastonetes Gram negativos. Dentre eles, a *Escherichia coli* causa aproximadamente 80% das infecções agudas nos pacientes sem cateteres, anormalidades urológicas ou cálculos. Outros bastonetes Gram negativos, em especial, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp., são responsáveis por uma proporção menor de infecções sem complicações. O *Staphylococcus saprophyticus*, que é um coco Gram positivo, geralmente corresponde de 10 a 15% das ITUs sintomáticas em mulheres jovens e sexualmente ativas (STAMM, 2002).

1.1.4 - Diagnóstico

O diagnóstico microbiológico da ITU inicia com a adequada coleta da urina. A urina obtida do jato médio através de técnicas assépticas, em não vigência de antibioticoterapia, é a mais utilizada para a urocultura. Este método possui as vantagens de ser não invasivo, simples e de baixo custo, requerendo, todavia, assepsia adequada, a fim de evitar contaminação com a microbiota comensal da uretra e do próprio tecido adjacente ao orifício uretral (HEILBERG et al, 2003; WILSON et al, 2004).

A amostra deve ser processada em até 2 horas após sua coleta ou 24 horas sob refrigeração, se não for acrescida de conservante. A técnica utilizada para semeadura da amostra é semiquantitativa, utilizando o método da alça calibrada, na diluição 1:1000, o que permite a semiquantificação do uropatógeno em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). Uma contagem igual ou superior 10^5 UFC/mL é utilizada como

critério de positividade nas amostras que apresentem crescimento de uma única espécie de microrganismo (HEILBERG, et al, 2003; KASS, 1956; WILSON, et al, 2004).

1.1.5 - *Tratamento*

O tratamento das ITUs baseia-se na previsibilidade dos microrganismos isolados e em seus respectivos padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos. Norteado por estes princípios, é recomendado que o tratamento empírico seja iniciado nos indivíduos com suspeita clínica de ITU-AC não complicada, mesmo sem o isolamento prévio do uropatógeno. A realização da urocultura, porém, é recomendada para mulheres com apresentação atípica, com episódios de recorrência sintomática após terapia ou quando há suspeita de pielonefrite (HOOTON, 2003).

A utilização de Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT) por três dias é preconizada como tratamento empírico para ITU-AC, sendo de equivalente efeito o uso de Fluoroquinolonas como: Norfloxacin, Ofloxacin e Ciprofloxacina (WARREN et al,1999). A utilização das Fluoroquinolonas geralmente não é recomendada, devido ao maior custo e pela possibilidade de selecionar cepas resistentes. Contudo, estes antimicrobianos podem ser uma opção na terapia empírica inicial em comunidades com altas taxas de resistência ao SXT (>20%) entre os uropatógenos. Outras opções incluem a utilização de Nitrofurantoína, durante 7 dias ou Fosfomicina em dose terapêutica única, porém, mais estudos devem ser realizados para garantir que esses fármacos apresentam a mesma eficácia terapêutica para o tratamento de ITUs-AC não complicadas (LE e MILLER, 2001; WARREN et al,1999).

1.2 - Resistência aos Antimicrobianos

A resistência entre os isolados de *E. coli* frente aos antimicrobianos cresceu progressivamente, nas últimas cinco décadas. Esse aumento tem comprometido o uso de Ampicilina, Cefalosporinas, SXT e mais recentemente de Fluoroquinolonas. Por isso, a escolha da terapia empírica para o tratamento de 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. (GUPTA et al, 2001; GUPTA et al, 2002).

Schito e colaboradores (2009) conduziram um estudo internacional de vigilância epidemiológica em nove países da Europa e no Brasil. O objetivo era avaliar a prevalência e o padrão de susceptibilidade dos patógenos aos antimicrobianos, em indivíduos adultos com ITU-AC. Em 77% dos casos a *E. coli* foi o microrganismo isolado. Entre estes, 10% apresentavam resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo, as resistências mais comuns a: Ampicilina, SXT e Ácido nalidíxico com taxas de 48%, 29% e 19%, respectivamente. A prevalência de resistência à Ciprofloxacina variou de 1,4% na França até 12,9% na Rússia, no Brasil a taxa foi de 10,8%.

Em Israel, Rock e colaboradores (2007) reportaram que ao longo de 10 anos (1995 - 2005), a taxa de resistência à ciprofloxacina aumentou significativamente,

passando de 6% para 10%, enquanto as taxas de resistência à SXT mantiveram-se relativamente constantes, passando de 29% para 28%.

No Canadá, ao contrário de outros países, estudos ainda corroboram a possibilidade de se utilizar SXT como antibiótico de primeira escolha, porém devem ser consideradas as diferenças regionais. McIsaac e colaboradores (2006) demonstraram taxas de resistência entre 11,4% e 20,5% para SXT e variações de 3,0% a 15,8% para ciprofloxacina nas diferentes comunidades do Canadá.

O estudo de vigilância epidemiológica conduzido por Andrade e colaboradores (2006) em alguns países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, México e Venezuela) revelou taxas ainda maiores de resistência para Ciprofloxacina. O Brasil apresentou as menores taxas de resistência, a este antimicrobiano, dentre os países pesquisados (11,1%), seguido de Chile (13,5%), Argentina (24,7%), Venezuela (28,4%) e México (72,2%).

No Brasil, diferentes estados apresentaram variações nas taxas de resistências dos isolados de *E.coli* aos antibióticos de interesse clínico: 11,9% para ciprofloxacina 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 Ciprofloxacina e SXT, respectivamente (KOCK et al, 2008), e em Brasília, 9,1% para ciprofloxacina e 49,4% para SXT (PIRES et al, 2007).

1.3 - Causas e Mecanismos de Aquisição e Disseminação da Resistência

A resistência aos antimicrobianos pode ser adquirida basicamente por dois mecanismos: mutação espontânea e aquisição de genes de resistência. Apesar de mutações pontuais ocorrerem em uma baixa frequência, aproximadamente 2×10^{-3} por genoma, em decorrência do número de microrganismos que compõem nossa flora ser tão elevado (estimado em trilhões), a probabilidade de mutações que favoreçam a resistência bacteriana após o tratamento de infecções com antibióticos torna-se relevante (FURUYA et al, 2006).

Outro meio de aquisição de resistência se dá por meio da transferência horizontal de genes entre os microrganismos, que assume grande importância na disseminação da resistência. A resistência transferível ocorre quando um dado microrganismo recebe material genético de outro, passando a expressar a característica contida no gene recentemente adquirido. Esse material genético que contém a informação que expressa a resistência pode ser transferido de algumas formas: transformação, transdução e conjugação (FURUYA et al, 2006).

A vantagem seletiva concedida por estes mecanismos é o que permite a seleção desses microrganismos e disseminação de resistência na comunidade. A pressão seletiva exercida pelo consumo de antibióticos no tratamento de infecções em humanos tanto no âmbito hospitalar como comunitário, bem como a utilização de antimicrobianos e moléculas análogas como promotoras de crescimento e tratamento de infecções em animais de criação para abate são fatores que devem ser considerados no entendimento desse processo.

O uso de antibióticos e moléculas análogas como promotoras 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 Fluorquinolonas) (PHILLIPS et al, 2004). Portanto, essa prática pode exercer uma pressão seletiva importante na comunidade.

Diversos estudos realizados com intuito de demonstrar a relação entre aumento do consumo de antimicrobianos na comunidade e a elevação das taxas de resistências entre isolados de *E. coli* apresentam resultados divergentes. Como por exemplo, no trabalho realizado por Kahlmeter e colaboradores (2003), em indivíduos com ITU-AC, nenhuma associação estatisticamente significativa foi evidenciada entre a resistência de isolados de *E. coli* e o consumo de Amoxicilina-Clavulanato, Cefadroxil, Fosfomicina, Sulfonamidas, Trimetoprim e SXT. Porém, foi encontrada uma correlação significativa entre o consumo e o aumento da resistência para Ciprofloxacina, Ácido nalidíxico, Gentamicina e Nitrofurantóina.

No trabalho de Colgan e colaboradores (2008), nenhuma associação foi encontrada entre a resistência ao SXT e o uso deste antimicrobiano em pacientes com ITU-AC. No Reino Unido, apesar da diminuição na prescrição de SXT, as taxas de resistência entre os isolados de *E. coli* mantiveram-se elevadas (ENNE et al , 2001).

Livermore e colaboradores (2002) notaram que as taxas de resistência às Fluoroquinolonas entre os isolados de *E. coli* aumentaram, apesar do declínio no número de prescrições destas drogas na comunidade. 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).

Os trabalhos acima são contraditórios no sentido de apoiar a hipótese de que apenas pressão seletiva seja determinante no aumento das taxas de resistência aos antimicrobianos na comunidade. Bartoloni e colaboradores (2004) estudando as taxas de resistência aos antimicrobianos em isolados de *E. coli* de ITU em uma comunidade rural da Bolívia, considerada isolada e de difícil acesso, onde o uso de antimicrobianos era mínimo, observaram que nesse local 67% dos isolados de *E. coli* apresentavam resistência a pelo menos um antimicrobiano; as taxas mais elevadas foram observadas para Tetraciclina (64%), Ampicilina (58%) e SXT (50%). Os dados acima relatados fornecem evidências de que o aumento e a diminuição das taxas de resistência em determinada comunidade podem não ser influenciados apenas pelo consumo de antimicrobianos, mas sim, pela introdução, disseminação e persistência de determinados grupos clonais multirresistentes na comunidade.

1.4 – A Biologia Molecular na Investigação Epidemiológica

A epidemiologia visa identificar a distribuição da doença no tempo e no espaço, bem como os fatores que determinam a transmissão, manifestação e progressão da doença. As técnicas moleculares quando aplicadas à epidemiologia visam estratificar e refinar os dados de forma mais confiável através de medições mais sensíveis e

específicas, facilitando assim, as investigações epidemiológicas (FOXMAN, B.; RILEY, L., 2001).

A tipagem de microrganismos, capacidade de identificá-los ao nível da espécie e de discriminar entre indivíduos da mesma espécie, conheceu grandes avanços nos últimos anos, tendo sido influenciada por uma série de novos métodos que fazem uso da grande variação encontrada no DNA destes microrganismos (MASLOW et al, 1993).

A premissa básica inerente a qualquer sistema de tipagem é que isolados epidemiologicamente relacionados são derivados da expansão clonal de um precursor único e, conseqüentemente, compartilham características que diferem dos isolados não relacionados. Esses métodos fornecem informações úteis para a vigilância epidemiológica de doenças infecciosas, que é um processo sistemático e contínuo de coleta de dados, análise, interpretação, avaliação de tendências da doença e concepção de formas de controlá-las (MASLOW et al, 1993).

Antes de um método de tipagem ser utilizado em uma dada situação, a sua adequação, deve ser claramente demonstrada. Cada método de tipagem, portanto, precisa ser avaliado e validado em relação a uma série de critérios. Estes podem ser divididos em critérios de desempenho e de conveniência (OLIVE, D. M.; BEAN, P., 1999).

Os critérios de desempenho podem ser caracterizados em termos de: tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, estabilidade e concordância epidemiológica. Uma vez que o valor intrínseco de um método, bem como a sua adequação para a caracterização de uma determinada espécie, forem estabelecidos com base nos critérios de desempenho, outros critérios, relacionados com a viabilidade ou conveniência,

precisam ser considerados. Estes parâmetros são importantes para a seleção de um método de tipagem apropriado, e dependem de uma série de fatores, como a dimensão da investigação e os recursos financeiros e técnicos disponíveis. Os seguintes critérios de conveniência, portanto, precisam ser considerados: acessibilidade, flexibilidade, rapidez, facilidade de uso, custos e adequação dos resultados para informatização, análise e armazenamento dos dados (VAN BELKUM et al, 2007).

Métodos genotípicos de tipagem avaliam a variação no genoma das bactérias isoladas em relação à composição (por exemplo, a presença ou ausência de plasmídeos); estrutura geral (perfis de restrição por endonuclease, o número e posição de elementos repetitivos), ou seqüência precisa de nucleotídeos (de um ou mais genes ou regiões intergênicas) (VAN BELKUM et al, 2007).

São diversas as técnicas que podem ser utilizadas para tipagem de uropatógenos. Os métodos baseados em PCR-fingerprinting são considerados flexíveis, de fácil e rápida execução, porém possuem baixa reprodutibilidade inter-corrída e inter-laboratório. A interpretação dos padrões de amplificação e dos critérios utilizados para delineamento de clones são frequentemente de difícil interpretação (STRULENS et al, 1996).

A técnica mais discriminatória, exceção do seqüenciamento do genoma, é a tipagem por *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE). Nesta metodologia, o DNA bacteriano total é eletroforeticamente separado após digestão com endonucleases de restrição, que reconhecem 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. Este é um dos métodos de maior reprodutibilidade

dentre as técnicas de tipagem correntes, podendo ser utilizado para tipagem de diversas espécies bacterianas (JOHNSON, J. R.; RUSSO, T., 2005)

Como ocorre com qualquer teste, os resultados obtidos são mais eficazes quando utilizados para complementar e não substituir as hipóteses e as perguntas cuidadosamente desenvolvidas pelo clínico ou epidemiologista. Idealmente, a tipagem deve ser feita de forma independente pelo pesquisador para evitar viés, embora os resultados devam ser analisados de forma conjunta (MASLOW et al, 1993).

1.5 - Transmissão e Disseminação Clonal

O mecanismo pelo qual as cepas de *E. coli* uropatogênicas se disseminam na comunidade ainda não está claro. Porém, a colonização do trato gastrointestinal com cepas de *E. coli* resistentes aos antibióticos tem sido demonstrada em indivíduos que viajaram para áreas com alta prevalência de resistência, presumivelmente essa contaminação ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminada (MURRAY et al, 1990).

A via fecal-oral é sugerida pelas observações de transmissão de *E. coli* entre crianças em creches e também de crianças colonizadas com esta bactéria para seus familiares (FORNASINI et al, 1992). Há também evidências de que cepas uropatogênicas podem, ocasionalmente, ser compartilhadas entre os parceiros sexuais (FOXMAN, B.; BROWN, P., 2003)

Embora a ITU normalmente não seja considerada uma doença associada a surtos epidêmicos, certas linhagens uropatogênicas de *E. coli* podem sim, causar surtos na comunidade. Entre 1986-1987, a *E. coli* O15:K52:H1 causou um surto de cistites,

pielonefrites e septicemias no sul de Londres (PHILLIPS et al, 1988). Outros surtos de ITU-AC causados por *E. coli* foram descritos em Copenhague, na Dinamarca, causados pelo sorotipo O78:H10 (OLESEN et al, 1994) assim como outro surto maior no Canadá, causado por uma cepa de *E. coli* produtora de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) (PITOUT et al, 2005).

Em 2001, Manges e colaboradores realizaram um estudo nos EUA com amostras de *E. coli* provenientes de mulheres com ITU em centros médicos universitários de três estados diferentes: Califórnia, Michigan e Minnesota. Após o isolamento e genotipagem por ERIC-PCR pôde-se observar que um único grupo clonal era o responsável por quase metade das ITUs-AC que exibiam resistência a SXT. Esse estudo forneceu evidências de como um único grupo clonal pode contribuir para o aumento da resistência em *E. coli*. Esses autores também descreveram a presença deste clone em fezes de pessoas saudáveis da comunidade, sugerindo que uma possível fonte alimentícia poderia ser a responsável pela disseminação de grupos clonais na população (MANGES et al, 2001).

Smith e colaboradores (2008), dando continuidade ao estudo desenvolvido por Manges e colaboradores (2001), avaliaram durante quatro anos o perfil de sensibilidade de cepas de *E. coli* isoladas de ITU-AC e a participação de grupos clonais na disseminação de resistência a SXT. Ao final do estudo, constataram que a prevalência da resistência aos antimicrobianos era influenciada por poucos grupos clonais, sugerindo, assim, que a introdução de grupos clonais com determinado padrão de resistência em uma comunidade tem um papel de maior relevância na mudança dos perfis de sensibilidade dos isolados de *E. coli* do que a pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antibióticos nessa população.

Ramchandani e colaboradores (2005), tentando ratificar a importância das fontes alimentícias na disseminação de cepas de *E. coli* resistentes a determinados antimicrobianos, avaliaram 495 cepas isoladas de fontes não humanas (ambientais e animais) entre 1965 e 2002, incluindo cepas que possuíam o mesmo sorogrupo encontrado entre os grupos clonais associados a infecções em humanos. Dos 495 isolados, 128 (26%) eram indistinguíveis do grupo clonal associado a infecções em humanos, utilizando-se a técnica de ERIC-PCR. Destes 128 isolados, 79% foram idênticos ao grupo clonal quando analisados por RAPD e 1 isolado bovino, revelou, pela técnica de PFGE, uma semelhança de 94% com o grupo clonal associado à ITU em humanos. Segundo os autores, esses achados ratificam a possibilidade de disseminação de *E. coli* uropatogênica por via alimentícia.

Portanto, o estudo e caracterização da distribuição clonal de cepas de *E. coli* isoladas de ITU-AC pode contribuir para o entendimento dos mecanismos de aquisição e disseminação de resistência na comunidade.

2.0 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar a distribuição clonal de cepas de *E.coli* isoladas em ITU-AC.

2.2 – Objetivos Específicos

- 1- Subtipar cepas de *E. coli* isoladas em ITU-AC utilizando a técnica de PFGE.
- 2- Comparar a composição clonal das cepas de *E. coli* de acordo com a presença ou ausência de resistência à Ciprofloxacina.
- 3- Correlacionar a composição clonal com as características fenotípicas de resistência dos isolados de *E. coli* em ITU-AC.

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Locais de Estudo

Laboratório de Epidemiologia Molecular e Bioestatística do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ, Bahia e os Laboratórios de Microbiologia clínica do Hospital Santo Antônio (HSA) e do Hospital São Rafael (HSR).

3.2 - População

Amostra consecutiva de cepas de *Escherichia coli* isoladas de urocultura de pacientes ambulatoriais atendidos no laboratório do HSA ou do HSR, de novembro de 2001 a julho de 2002.

3.2.1 - *Critérios de Inclusão*

Pacientes com 18 anos ou mais, com infecção do trato urinário adquirida na comunidade.

3.2.2 - *Critérios de Exclusão*

Pacientes com infecção urinária nosocomial ou pacientes submetidos à manipulação instrumental do trato urinário nos últimos 30 dias.

3.3 - Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de corte-transversal onde se avaliou a composição clonal de cepas de *E. coli* isoladas de pacientes ambulatoriais atendidos em serviços público e privado de assistência a saúde.

3.4 - Coleta de dados

As informações sócio-demográficas e sobre internações e procedimentos hospitalares nos últimos 30 dias foram obtidas no HSA através de entrevistas realizada por pessoal treinado para este fim. No HSR, estas informações foram retiradas da solicitação de exame de urocultura.

3.5 - Isolamento de *E. coli*

As amostras de urina foram coletadas e semeadas por meio de técnica semiquantitativa em Ágar Sangue (PlastLabor, Rio de Janeiro, Brasil) e Ágar MacConkey (Difco, Detroit, USA) com auxílio de alça calibrada de 1 μ L e incubadas a 37°C por 18-24 horas em estufa bacteriológica. Sendo a avaliação fenotípica preliminar realizada pela observação de colônias rosadas (fermentação da lactose positiva) na superfície do ágar MacConkey. A seguir, uma colônia representativa foi avaliada quanto às suas características bioquímicas para identificação definitiva.

3.6 - Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos

As cepas de *E. coli* isoladas no serviço público de assistência a saúde tiveram seu perfil de susceptibilidade determinados frente a 18 antibióticos (ampicilina, amoxicilina, ácido nalidíxico, amicacina, cefalotina, ceftazidima, cefuroxima, cefepime, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, nitrofurantoína, norfloxacina, ácido pipemídico, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim) (CECON, São Paulo, Brasil), através do teste padronizado de difusão em disco, recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e descrito no Protocolo M100 deste comitê, cujo controle de qualidade foi realizado com a cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Três a cinco colônias de morfologia semelhante em cultura pura obtidas em Ágar MacConkey foram diluídas em 5 mL de solução fisiológica salina estéril a 0,85% e homogeneizadas com finalidade de obter uma turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland. A inoculação das placas de Muller Hinton (AMH; Difco, Detroit, USA) foi realizada com “swabs” umedecidos na suspensão e posteriormente semeados em três sentidos diferentes na placa. Após seco o inóculo, discos de antimicrobianos foram depositados nas placas manualmente com o auxílio de uma pinça, em condições de esterilidade em fluxo laminar. Após 18-24 horas de incubação a 37°C foi realizada a leitura com auxílio de uma régua milimétrica transparente para determinar o diâmetro (em mm) do halo de inibição, e a interpretação foi realizada obedecendo aos padrões estabelecidos pelo CLSI. No serviço privado de assistência a saúde a susceptibilidade foi determinada através de método automatizado (Vitek, St. Louis, MO) de acordo com a recomendação do fabricante. As cepas com susceptibilidade intermediária foram interpretadas como sensíveis. Para efeito desse estudo, os isolados que apresentaram resistência a três ou mais drogas foram designados como resistentes a múltiplas drogas (RMD).

3.7 - Genotipagem por Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Para a subtipagem dos isolados de ITU-AC foi utilizado um protocolo modificado para subtipagem de *E. coli* (O157:H7) por PFGE, estabelecido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (BENDER et al, 1997). Foram tipados por esse método 88 cepas de *E. coli*, que compreendiam uma amostra aleatória de 70% (45 de 64) das cepas resistentes à Ciprofloxacina e 28% (43 de 155) das cepas sensíveis a todos os antimicrobianos. Para realização do PFGE, cada isolado foi inicialmente semeado em

TSA (Trypticase Soy Agar) e incubado em estufa a 37°C por 18-24 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) (SIGMA-ALDRICH®) overnight – 1mL do tampão “ES” e 40µL de proteinase K. Durante três dias, os “plugs” foram lavados sucessivamente com tampão “TE” (10 mM Tris, 1 mM 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) (SIGMA-ALDRICH®).

Para a corrida eletroforética, foi utilizado o CHEF-DR® II (Bio-Rad), 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 20 horas. Após a corrida o gel foi corado com Brometo de etídio.

3.8 - Análise Estatística

Os dados foram digitados em duplicidade e checados para erros de entrada e valores fora do intervalo ou inconsistentes. O banco de dados gerado foi então analisado quanto à distribuição de frequência das variáveis de interesse e à tabulação das principais comparações. Medidas de tendência central (média, mediana e moda) foram estimadas conforme a situação. A significância estatística das diferenças entre duas ou mais proporções foi avaliada através do teste do Qui-quadrado, enquanto que as diferenças entre médias foram avaliadas através do teste de t de Student ou da análise de variância (ANOVA). Foram considerados significativos estatisticamente aqueles

resultados com $p < 0,05$ (bi-caudal). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico Stata.

Para determinação de perfil de mobilidade eletroforética, foi utilizado o programa, Gel Compar II. A comparação das amostras foi realizada a partir de dendrograma utilizando o coeficiente de Dice com tolerância de 1,5%. Os critérios estabelecidos por Tenover (1995) foram empregados para avaliar uma possível relação genética entre as cepas.

3.9 - Considerações Éticas

O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos respectivos locais de estudo. 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.

4.0 - RESULTADOS

Um total de 463 isolados de *E. coli* foram coletados consecutivamente, de indivíduos que apresentavam idade maior ou igual a dezoito anos, 294 (63,5%) eram do serviço privado de assistência a saúde e 169 (36,5%) do serviço público (Figura1).

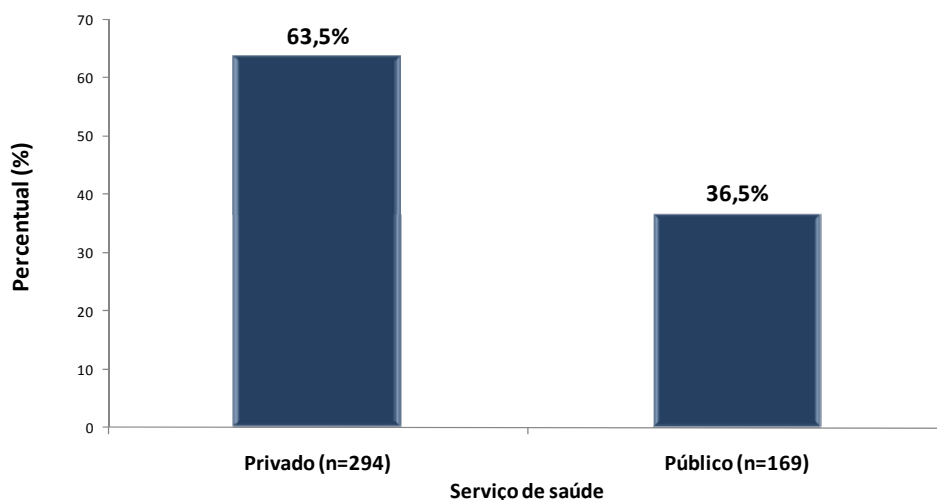


Figura 1. Distribuição quanto ao tipo de atendimento do serviço de saúde dos 463 pacientes com ITU adquirida na comunidade, Salvador, 2001-2002.

A maioria dos pacientes na nossa amostra era do sexo feminino (82%) (Figura 2a) e quando os dados foram estratificados por serviço de saúde a predominância do sexo feminino persistiu de maneira semelhante (Figura 2b e 2c).

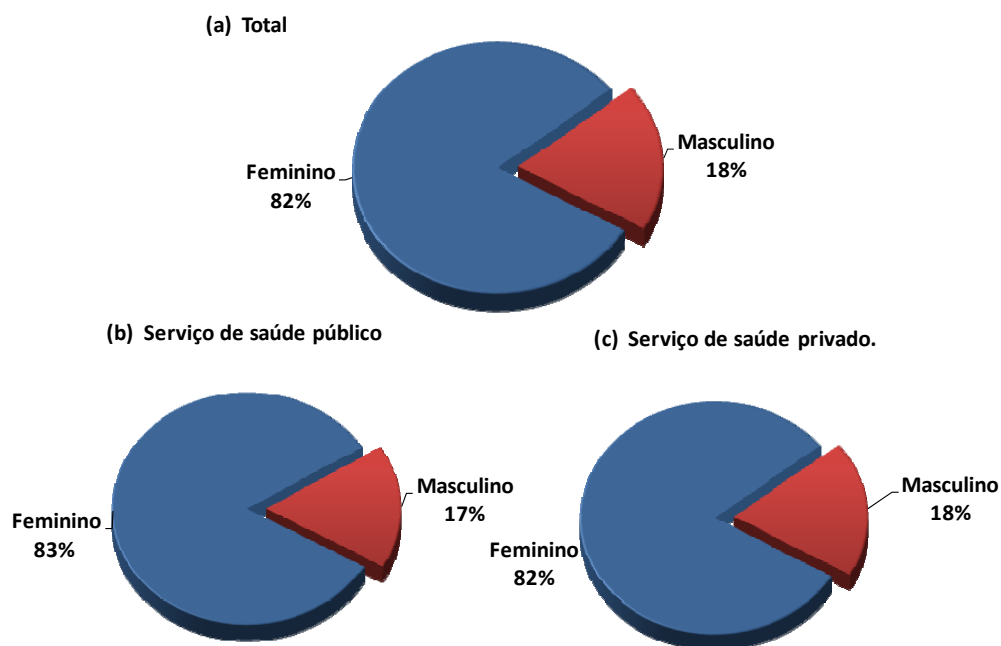


Figura 2. (a) Distribuição por sexo dos 463 indivíduos com ITU adquirida na comunidade. (b) Serviço público (n=169). (c) Serviço privado (n=294).

A análise da distribuição etária dos indivíduos com ITU-AC (Tabela 1) mostra que os pacientes no serviço público apresentavam, em média, idade superior aos pacientes do serviço privado. Os homens, tanto do serviço público como no privado, apresentaram idade média mais alta, quando comparados com mulheres do mesmo serviço.

Tabela 1. Distribuição etária de 463 adultos com infecção do trato urinário adquirida na comunidade de acordo com tipo de serviço de saúde e sexo, Salvador, Brasil, 2001-2002.

Idade	Serviço Público (n=169)			Serviço Privado (n=294)		
	Feminino (n=140)	Masculino (n=29)	valor de P*	Feminino (n=238)	Masculino (n=56)	valor de P*
Média (DP)	53 (21)	63 (20)	0.02^a	45 (18)	55 (19)	<0.01^a
Mediana [25% - 75%]	51 [34 - 72]	63 [58 - 74]	<0.01^b	43 [30 - 58]	55 [39 - 71]	0,04^b
Faixa etária em anos (%)						
18- 29	16	10		22	7	
30 - 39	19	3		21	20	
40 - 49	11	7	0.12^c	21	16	0,01^c
50 - 59	11	17		13	13	
≥ 60	43	63		23	44	

DP= Desvio padrão

^a Teste t-Student

^b Teste da Mediana

^c Teste Qui-quadrado

Quando a idade foi estratificada por faixas não houve diferença significativa na distribuição do número de ITUs entre homens e mulheres no serviço público. Embora, a maior parte das ITUs tenha ocorrido em pacientes com mais de 60 anos tanto no sexo masculino (63%) como no feminino (43%). No serviço privado, enquanto as mulheres foram igualmente afetadas em todas as faixas etárias, entre os homens, os mais velhos foram os mais acometidos (44%).

As prevalências globais de resistência para os 463 isolados de *E. coli* estão sumarizados na Tabela 2. As maiores taxas de resistência foram para Ampicilina (49%) e SXT (42%). 14% dos isolados avaliados apresentaram resistência a Ciprofloxacina. Para a maioria dos antimicrobianos testados a prevalência de resistência foi semelhante entre homens e mulheres. Entretanto, os indivíduos de sexo masculino apresentaram, taxas significativamente maiores de resistência para os seguintes antimicrobianos: Nitrofurantoína, Ácido nalidíxico e Ciprofloxacina.

Tabela 2. Prevalência (%) de resistência antimicrobiana em 463 isolados de *Escherichia coli* provenientes de Infecção do Trato Urinário adquirida na comunidade de acordo com sexo

Antimicrobianos	Feminino (n=378)	Masculino (n=85)	Total (n=463)	valor de p*
Amicacina	2	5	3	0,16
Ampicilina	50	46	49	0,58
Cefepime	1	1	1	0,91
Cefoxitina	2	5	2	0,12
Ceftazidima	1	1	1	0,73
Ceftriaxona	1	0	1	0,53
Cefalotina	11	13	12	0,61
Cloranfenicol	22	18	22	0,36
Ciprofloxacina	12	24	14	0,00
Gentamicina	2	5	2	0,12
Ácido nalidíxico	15	26	17	0,02
Nitrofurantiona	2	10	4	0,00
Norfloxacina	13	20	14	0,10
Sulfametoxazol-Trimetoprim	42	39	42	0,65
Tetraciclina	41	37	40	0,54

* Teste Qui-quadrado

Quando se comparou a prevalência de resistência antimicrobiana dos isolados de *E. coli* de acordo com sexo e tipo de serviço de saúde, observamos que os padrões de resistência eram semelhantes entre os serviços (Tabela 3). Entretanto, as taxas de resistência à Cefalotina e a SXT entre as mulheres do serviço público foram significativamente mais altas do que as apresentadas no serviço privado; de forma semelhante, os homens do serviço privado apresentaram maiores taxas de resistência para Ampicilina e Tetraciclina do que os homens do serviço público.

Tabela 3. Prevalência (%) de resistência antimicrobiana de 463 isolados de *Escherichia coli* provenientes de Infecção do Trato Urinário adquirida na comunidade de acordo com sexo e tipo de serviço de saúde, Salvador, Brasil, 2001-2002.

Antimicrobianos	Feminino (n=378)			Masculino (n=85)		
	Público (n=140)	Privado (n=238)	valor de P*	Público (n=29)	Privado (n=56)	valor de P*
Amicacina	4	1	0,12	12	2	0,06
Ampicilina	54	47	0,21	29	55	0,02
Cefepime	1	1	0,92	-	2	0,47
Cefoxitina	2	2	0,78	4	6	0,71
Ceftazidima	1	1	0,91	-	2	0,47
Ceftriaxona	2	-	0,72	-	-	-
Cefalotina	19	7	0,00	15	13	0,77
Cloranfenicol	25	21	0,44	7	23	0,08
Ciprofloxacina	12	12	0,97	19	26	0,51
Gentamicina	1	3	0,22	0	7	0,14
Ácido nalidíxico	13	16	0,40	18	30	0,23
Nitrofurantiona	1	3	0,14	4	13	0,18
Norfloxacina	13	13	0,87	14	24	0,32
Sulfametoxazol-Trimetoprim	49	38	0,04	39	39	1,00
Tetraciclina	42	40	0,61	15	49	0,00

* Teste Qui-quadrado

A distribuição do número de resistências é apresentada na tabela 4. Entre os isolados de *E.coli* no nosso estudo, 34% era sensível a todos os antimicrobianos testados (variando de 29% a 38%). Um total de 36% dos isolados era resistentes a três ou mais drogas (RMD). As maiores taxas de RMD foram encontradas entre os homens no serviço privado e as mulheres no serviço público de, 39% e 45%, respectivamente. No entanto, as diferenças encontradas não foram significativas, estatisticamente.

Tabela 4. Distribuição do número de resistências a antimicrobianos (%) em 463 isolados de *Escherichia coli* provenientes de infecção do trato urinário adquirida na comunidade de acordo o sexo e tipo de serviço de saúde, Salvador, Brasil, 2001-2002.

n° de resistências a antimicrobianos	n (% de isolados)	Feminino (n=378)			Masculino (n=85)		
		Público (n=140)	Privado (n=238)	valor de p*	Público (n=29)	Privado (n=56)	valor de p*
0	155 (34)	29	38		31	29	
1	62 (13)	11	13	0,067	31	13	0,159
2	79 (17)	15	18		14	19	
≥3	167 (36)	45	31		24	39	

Nota: 36% dos isolados eram resistentes a três ou mais antimicrobianos, sendo definido resistente a múltiplas drogas.

* Teste Qui-quadrado

Os fenótipos de RMD mais comuns foram listados na Tabela 5. Pode-se observar que um número grande de isolados apresentava o mesmo perfil fenotípico. Entre os isolados com resistência a três drogas, apenas dois fenótipos (SXT+AMP+TET e SXT+AMP+CHL) correspondiam a, aproximadamente, 50 % dos isolados desse grupo. Os isolados RMD com mais de três resistências apresentavam um núcleo comum de resistência, ao qual, de forma cumulativa, o microrganismo adquiria outras resistências. Em nosso estudo, este “núcleo” era formado pela resistência a SXT+AMP+TET, e a partir deste fenótipo eram acrescentadas novas resistências.

Tabela 5. Fenótipos de resistência antimicrobiana entre 167 isolados de *Escherichia coli* com resistência a múltiplas drogas provenientes de infecção do trato urinário adquirida na comunidade, Salvador, Brasil, 2001-2002.

n° de resistências aos antimicrobianos	Número de possíveis combinações*	% esperado dentro do grupo	Padrões de resistência mais comuns	n° de isolados observado	% observado dentro do grupo
3 (n=64)	455	0,2	SXT + AMP + TET SXT + AMP + CHL	24 8	38 13
4 (n=44)	1365	0,07	SXT + AMP + TET + CHL SXT + AMP + TET + CFL	21 8	48 18
5 (n=15)	3003	0,03	SXT + AMP + TET + CHL + CFL SXT + AMP + TET + CHL + NAL	2 1	13 7
6 (n=19)	5005	0,01	SXT + AMP + TET + CHL + NOR + NAL SXT + TET + CHL + CIP + NOR + NAL	3 3	16 16
≥7 (n=25)	6435	0,01	SXT + AMP + TET + CHL + CIP + NOR + NAL SXT + AMP + TET + CHL + CIP + NOR + NAL	10 2	40 8

SXT = Sulfametoxazol-trimetoprima; AMP = Ampicilina; TET = Tetraciclina; CHL = Cloranfenicol; CFL = Cefalotina; CIP = Ciprofloxacina; NOR = Norfloxacina; NAL = Ác. nalidíxico; NIT = Nitrofurantoina.

* Total de combinações de 15 elementos tomados p a p

$$C_{n,p} = \binom{n}{p} = \frac{n!}{p!(n-p)!}, 0 \leq p \leq n$$

A figura 3 apresenta o dendrograma gerado pela análise da tipagem das cepas no software Gelcompar com os respectivos padrões clonais. A análise genotípica das 88 cepas de *E. coli* por meio da técnica de PFGE permitiu caracterizar a presença de 20 grupos clonais que correspondiam a 61 cepas (69% de todas as cepas tipadas). Dos isolados tipados, 45 eram resistentes a Ciprofloxacina e 43 eram sensíveis a todos os antimicrobianos. 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, etc.

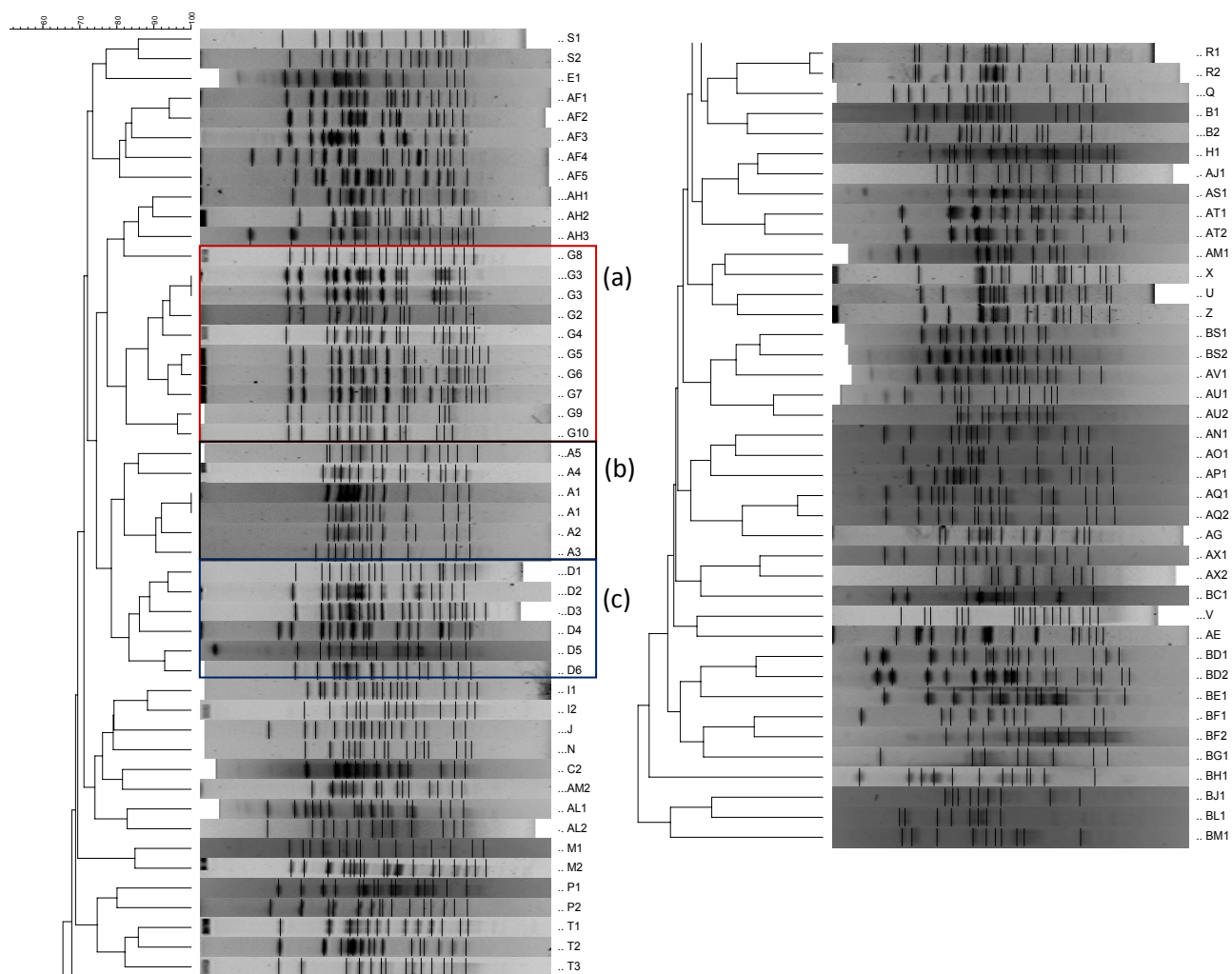


FIGURA 3. Dendrograma dos perfis de PFGE (*Xba*I) das 88 cepas de *Escherichia coli* isoladas em Salvador, 2001-2002. Em destaque os três principais grupos: (a) Grupo clonal G; (b) Grupo clonal A; (c) Grupo clonal D.

A maioria dos grupos clonais foi formada por duas ou três cepas, entretanto os grupos clonais G, A e D foram formados, respectivamente, por 10, 6 e 6 cepas representando, aproximadamente, 42% de todos os isolados resistentes à Ciprofloxacina. Esses três grupos clonais foram mais freqüentes entre as cepas resistentes à Ciprofloxacina (42%) do que entre as cepas sensíveis a todos os antimicrobianos (7%), $p = 0,001$ (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição clonal (%) de 88 cepas de *Escherichia coli* de acordo com o perfil de sensibilidade a Ciprofloxacina, Salvador, Bahia. 2001-2002.

Grupos	Ciprofloxacina		valor de p*
	Resistente n = 45	Sensível n = 43	
Grupo G	10 (22)	0 (0)	0,001
Grupo A	5 (11)	1 (2)	
Grupo D	4 (9)	2 (5)	
Outros Grupos	26 (58)	40 (93)	

* Teste Qui-quadrado

Na tabela 7, a análise da distribuição dos grupos clonais por sexo, tipo de serviço de saúde e resistência ou não a múltiplas drogas mostra uma predominância de cepas geneticamente relacionadas entre os indivíduos do sexo feminino (76%), porém, comparada com a distribuição dos grupos não clonais (68%) essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação ao local de isolamento houve uma homogeneidade na distribuição dos grupos clonais entre os diferentes serviços de saúde. A resistência a múltiplas drogas foi maior entre os grupos clonais (82%) quando comparada aos grupos não clonais (38%), dado estatisticamente significativo.

Tabela 7. Distribuição clonal (%) de 88 cepas de *Escherichia coli* de acordo com características selecionadas, Salvador, Bahia 2001-2002.

	Grupos Clonais			Outros*		p valor**
	G (n=10) n (%)	A (n=6) n (%)	D (n=6) n (%)	Total (n=22) n (%)	Total (n=66) n (%)	
Sexo						
Feminino	6 (67,0)	6 (100,0)	4 (66,70)	16 (76,2)	45 (68,2)	0,490
Masculino	3 (33,0)	0 (0,0)	2 (33,30)	5 (23,8)	21 (31,8)	
Local						
HSA	5 (50,0)	2 (33,3)	3 (50,0)	10 (45,5)	23 (34,8)	0,370
HSR	5 (50,0)	4 (66,7)	3 (50,0)	12 (54,5)	43 (65,2)	
RMD***	9 (90,0)	5 (83,3)	4 (66,70)	18 (81,8)	25 (37,9)	<0.001

* Grupos não clonais e grupos clonais com 2 ou 3 cepas

** Teste Qui-quadrado da comparação entre o total de grupo clonais e outros grupos.

***Resistência a Múltiplas Drogas

5.0 - DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo na nossa cidade a analisar a composição clonal de cepas de *E. coli*, avaliando a sua distribuição de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos.

Em nosso estudo, as taxas de resistência a alguns antimicrobianos foram altas (42% para SXT e 49% para Ampicilina), porém semelhantes a outros trabalhos prévios: Em São Paulo-SP, Kiffer e colaboradores (2007) reportaram taxas de 43% para Ampicilina e 34% para SXT. Schito e colaboradores (2009), em um estudo de vigilância internacional em nove países da Europa e no Brasil, relataram taxas globais de 48% para Ampicilina e 29% para SXT; nos Estados Unidos, 39% e 19% para Ampicilina e SXT, respectivamente (SAHM et al, 2001); em Kosova, 40% para Ampicilina e 29% para SXT (RAKA et al, 2004). Em conformidade com as atuais recomendações (HOOTON, 2004; WARREN et al, 1999), a utilização de SXT e AMP como terapia empírica de ITUs em nossa comunidade deve ser evitado.

A taxa de resistência à ciprofloxacina (14%) foi surpreendentemente alta, quando comparada a outros estudos semelhantes ao nosso, que avaliaram exclusivamente ITUs adquirida na comunidade: 4% em Ribeirão Preto/SP (CAMARGO et al, 2002); 3,7% nos Estados Unidos (SAHM et al, 2001); 4% na Rússia (STRATCHOUNSKI; RAFALSK, 2006); 1% na França (NABER et al, 2008). Outros trabalhos, entretanto, reportam taxas de resistência à Ciprofloxacina ainda mais elevadas que as nossas. Na Espanha, ANDREU e colaboradores (2008) relataram taxa de 24%. Em um estudo conduzido na América Latina foram reportadas as seguintes taxas de resistência à Ciprofloxacina: 24,7% na Argentina, 28,4% na Venezuela, chegando a 72,2% no México (ANDRADE et

al, 2006). Aypak e colaboradores (2009) reportaram taxa de 25% na Turquia. Na China, Ho e colaboradores (2007) relataram 22% de resistência à Ciprofloxacina entre os isolados de ITU-AC. Diferentemente do nosso estudo, a maioria destes trabalhos com taxas mais altas de resistência a Ciprofloxacina não utilizaram, na seleção das cepas, critérios que garantissem a inclusão apenas daquelas oriundas de ITU adquirida na comunidade (excluindo os casos de ITU complicada ou adquirida no ambiente hospitalar). A possível inclusão de cepas de *E. coli* com essas características faria com que as taxas de resistência à Ciprofloxacina pudessem estar superestimadas nesses estudos.

A detecção de uma alta prevalência de resistência à Ciprofloxacina no nosso trabalho traz a preocupação de uma possível limitação do uso dessa droga no tratamento empírico de ITU-AC na nossa comunidade em um futuro próximo, visto que, antibióticos antes de primeira escolha como Ampicilina e SXT já tiveram sua terapia empírica desaconselhada devido às altas taxas de resistência. A possível restrição de mais essa classe terapêutica em nossa comunidade pode tornar o tratamento empírico da ITU-AC ainda mais difícil e dispendioso.

Não houve diferenças significativas nas taxas de resistência aos antimicrobianos testados quanto ao gênero ou quanto ao tipo de serviço de saúde utilizado. Contudo, outros trabalhos avaliando indivíduos que possuíam ou não acesso a serviço privado de saúde evidenciaram diferenças em algumas características dessas populações: Chen e colaboradores (2002) encontraram associações significativas entre características sócio-econômicas como: raça, renda e acesso à rede pública de saúde com impacto direto na prescrição de drogas. Todd e colaboradores (2006) reportaram que crianças que não tinham acesso ao serviço de saúde privado apresentavam taxas significativamente

maiores de mortalidade, internação hospitalar, doenças imunopreveníveis e maior gravidade das doenças.

O percentual de isolados RMD em nosso estudo foi alto (36%), quando comparado com outros já reportados: 11% no Iran (MONIRI et al, 2003); 7,1% nos Estados Unidos (SAHM et al, 2001); 9,8% na Holanda (NYS et al, 2008); 22,2% no Rio de Janeiro (DIAS et al, 2009). A hipótese de que a aquisição de genes de resistência não é aleatória, é sugerido pelos fenótipos de resistência RMD apresentados em nosso estudo, onde um núcleo composto por três antibióticos, SXT+AMP+TET, mantinha-se constante, sendo acrescido cumulativamente de novas resistências. A transferência horizontal de integrons carreando seqüências de genes de resistência por elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou transposons, pode ser uma possível explicação para o surgimento das cepas RMD em nossa comunidade (LEVERSTEIN-VAN HALL et al, 2003).

Nos nossos resultados houve maior homogeneidade genética entre as cepas de *E. coli* resistentes à Ciprofloxacina. É importante salientar que esta avaliação foi feita com uma técnica de maior poder discriminatório (PFGE), quando comparada com outras técnicas comumente utilizadas (VAN BELKUM et al, 2007). Entre os isolados de *E. coli* tipados, três grupos clonais (G, A e D) correspondiam a 42% das cepas resistentes à Ciprofloxacina e a apenas 7% das sensíveis ($p < 0,001$). Todos os isolados do grupo clonal G foram resistentes à Ciprofloxacina, correspondendo a 22% dos isolados resistentes a essa droga ($p < 0,001$). Estes resultados corroboram outros já descritos, como os de Manges e colaboradores (2001) que encontraram apenas um grupo clonal como responsável por aproximadamente 50% das cepas resistentes à SXT em uma comunidade universitária no estado da Califórnia, Estados Unidos. Karlowsky e

colaboradores (2007) identificaram 2 grupos clonais como responsáveis por 57% dos isolados RMD. No Brasil, Dias e colaboradores (2009) relataram que apenas quatro grupos clonais causaram 43% das ITUs avaliadas. Smith e colaboradores (2008) afirmaram ao final de uma série de estudos de corte transversal que a prevalência da resistência aos antimicrobianos em sua comunidade era influenciada por um pequeno número de grupos clonais. Entretanto, estes trabalhos não são unânimes, já que outros autores não conseguiram demonstrar que a expansão clonal pode ser um fator determinante no aumento ou diminuição da prevalência de resistência aos antimicrobianos entre os isolados de *E. coli* na comunidade (FRANCE et al, 2005; SOLBERG et al, 2006; UCHIDA et al, 2010).

O uso intenso e, na maioria das vezes, pouco judicioso dos antimicrobianos no ambiente hospitalar sabidamente favorece a seleção, disseminação e persistência de microrganismos multirresistentes (CHRISTIAN et al, 2010; YAN et al, 2010; DEPLANO et al 2010). Nesse meio fechado e com uma população limitada é fácil compreender a vantagem de determinados grupos clonais multirresistentes em se disseminar através do contato direto pessoa-pessoa ou através de fômites, perpetuando-se através da expansão clonal. Assim, no ambiente hospitalar é de se esperar a manutenção da homogeneidade genética, devido à pressão seletiva constantemente imposta. Na comunidade, entretanto, seria esperado o contrário, isto é, uma maior diversidade genética, visto que o uso de antimicrobianos não é tão extensivo como nos hospitais e a população é muito maior e aberta. Porém, nosso estudo apontou uma homogeneidade clonal entre os uropatógenos adquiridos na comunidade, o que pode sugerir que outros fatores ambientais possam atuar na seleção e disseminação de microrganismos resistentes nestas circunstâncias.

Uma hipótese plausível seria que o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e no tratamento de animais de criação para abate poderia favorecer a seleção em larga escala da flora de microrganismos nestes animais. Uma vez ocorrido esse processo, os produtos alimentícios derivados destes animais poderiam ser contaminados por essas cepas resistentes. Estes alimentos poderiam funcionar como meio de introdução e disseminação de cepas resistentes ou como fonte de transferência de elementos de resistência entre os microrganismos que fazem parte do trato digestivo de homens e animais. Alguns estudos reportam o potencial que os promotores de crescimento têm em selecionar cepas resistentes (SALYERS et al, 2004) e existem evidências de que esses microrganismos podem ser transferidos dos animais para os seres humanos (BARTON et al, 2000; VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH et al, 2000; VINCENT et al 2010). Esses trabalhos corroboram a hipótese de que determinadas cepas resistentes de *E. coli* possam, através da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos como promotores e no tratamento em animais de abate, ser selecionadas e introduzidas na comunidade, tornando-se comensais do trato digestivo do homem e, posteriormente, causarem infecções do trato urinário em humanos.

6.0 - CONCLUSÕES

1. As altas taxas de resistência a AMP (49%) e SXT (42%) impossibilitam a utilização dessas drogas no tratamento empírico de ITUs em nossa comunidade.
2. A resistência à Ciprofloxacina encontrada em nosso estudo (14%) é uma das mais altas já descritas em estudos de ITU exclusivamente adquirida na comunidade. O aumento da prevalência de resistência a Ciprofloxacina pode inviabilizar o uso desse antibiótico no tratamento empírico de ITU-AC, dificultando a escolha terapêutica desta condição, além de torná-las mais dispendiosas.
3. O número de isolados RMD (36%) em nosso estudo foi alto quando comparado a outros trabalhos já reportados. Esse achado também tem impacto negativo nos custos e terapêutica da ITU-AC.
4. O perfil fenotípico de RMD dos nossos isolados sugere que o acréscimo de resistência é cumulativo. Corroborando a hipótese de que o mecanismo de aquisição de resistência ocorre através de plasmídios e transposons, contendo seqüências de genes de resistência que são expressos de forma conjunta.
5. As cepas resistentes à Ciprofloxacina apresentaram maior homogeneidade genética na sua composição clonal, sugerindo que a introdução e disseminação de grupos clonais resistentes podem ter importante papel no aumento da resistência a antimicrobianos na comunidade.
6. O uso indiscriminado e persistente de antimicrobianos é uma teoria aceitável para o aumento da resistência aos antimicrobianos. Entretanto, o aumento da resistência na comunidade às custas de grupos clonais específicos não é explicado satisfatoriamente por esta teoria. Novos estudos, avaliando o

mecanismo do aumento de resistência bacteriana na comunidade precisam ser realizados.

7.0 - LIMITAÇÕES E MÉRITOS

Entre os méritos do nosso estudo, destacamos: a composição da nossa amostra formada predominantemente por pacientes do sexo feminino e a distribuição etária dos indivíduos com ITU em nosso estudo, sugerem que a nossa amostra é representativa da população de pacientes com ITU-AC. Isto confere validade externa para os nossos dados, permitindo que eles sejam generalizados para população geral.

A seleção cuidadosa dos casos do nosso estudo, com a inclusão de cepas de *E. coli* isoladas de ITU adquirida exclusivamente na comunidade evitou a inclusão inadvertida de casos de infecção nosocomial. Desse modo, nossas taxas de resistência a antimicrobianos, mesmo quando altas, não são resultado da inclusão de cepas resistentes oriunda de ambiente hospitalar.

Uma possível limitação do nosso estudo é que as técnicas empregadas para determinação do perfil de sensibilidade nos dois laboratórios foram diferentes (antibiograma manual e automatizado). Entretanto, ambas as metodologias utilizadas seguiram rigorosamente todos os controles de qualidade necessários que envolvem: os de temperatura: das geladeiras e estufas; dos meios utilizados para realização dos antibiogramas manuais e a realização de testes com cepas padrões ATCC (*American Type Culture Collection*) para garantir a reprodutibilidade da técnica.

A técnica de PFGE utilizada em nosso estudo é considerada padrão ouro dentre as técnicas de tipagem para bactérias. Fornecendo assim, um método válido para estimar a distribuição clonal das cepas de *E. coli* avaliadas em nosso trabalho.

8.0 – REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. S.; SADER, H. S.; JONES, R. N.; PEREIRA, A. S.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, n 7, p. 741-748, 2006.
- ANDREU, A.; PLANELLS, I. et al. Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea. Estudio nacional multicêntrico. **Medicina Clínica**. v. 130, n.13, p. 481-6, 2008.
- AYPAK, C., ALTUNSOY, A.; DÜZGÜN, N. Empiric antibiotic therapy in acute uncomplicated urinary tract infections and fluoroquinolone resistance: a prospective observational study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 8, n. 27, 2009.
- BARTOLONI, A., BARTALESI, F.; MANTELLA, A.; DELL'AMICO, E.; ROSELLI, M.; STROHMEYER, M.; BARAHONA, H. G.; BARRON, V. P.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G. M. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. **Journal of Infectious Diseases**. v. 189, p. 1291–1294, 2004.
- BARTON, M.D., 2000. Antibiotic use in animals feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**. v. 13, p.279–299, 2000.
- BENDER, J. B.; HEDBERG, C. W.; BESSER, J. M, BOXRUD, D. J.; MACDONALD, K. L.; OSTERHOLM, M. T. Surveillance for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 388-94, 1997.
- Centers for Disease Control and Prevention. Preventing emerging infectious diseases: A strategy for the 21st century. Overview of the updated CDC plan. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 47, p. 1-14,1998. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00054779.htm>. Acesso em: 11 nov. 2009.
- CHEN, A. Y.; CHANG, K. K. Factors Associated With Prescription Drug Expenditures Among Children: An Analysis of the Medical Expenditure Panel Survey. **Pediatrics**. v. 109, n. 5, 2002.
- CHRISTIAN, N. A.; ROYE-GREEN, K.; SMIKLE. M. Molecular epidemiology of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* at a Jamaican hospital, 2000 – 2004. **BMC Microbiology**. v. 10, n. 27, 2010.
- COLGAN, R., JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M.; GUPTA, K. Risk factors for trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in patients with acute uncomplicated cystitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, p. 846–851, 2008.

DE CAMARGO, C. B. S.; PEDRO, C. C.; LOURENÇO, D. S.; GIRONI, R. H. A. R.; MARTINEZ, R. Infecção de vias urinárias na com unidade de Ribeirão Preto - SP: Etiologia, Sensibilidade Bacteriana a Antimicrobianos e Implicações Terapêuticas **Medicina, Ribeirão Preto**. v. 35, p.173-178, 2002.

DEPLANO, A.; WITTE, W.; VAN LEEUWEN, W. J.; BRUN, Y.; STRUELENS. M. J. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 6, n. 5, 2000.

DIAS, R. C. S.; MARANGONI, D. V.; SMITH, S. P.; ALVES, E. M.; PELLEGRINO, F. L. P. C.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. Clonal Composition of *Escherichia coli* Causing Community-Acquired Urinary Tract Infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 4, 2009.

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

FORNASINI, R.; REVES, R. R.; MURRAY, B.E.; MORROW, A. L. PICKERING, L. K. Trimethoprim-resistant *Escherichia coli* in households of children attending day care centers. **Journal of Infectious Diseases**. v. 166, p. 326-30, 1992.

FOXMAN, B. Contributions of Molecular Epidemiology to the Understanding of Infectious Disease Transmission, Pathogenesis, and Evolution. **Annals of epidemiology**. v. 17, p. 148-56, 2007.

FOXMAN, B.; BROWN, P. Epidemiology of urinary tract infections, transmission and risk factors, incidence, and costs. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 17, p. 227-41, 2003.

FOXMAN, B. Epidemiology of Urinary Tract Infections: Incidence, Morbidity, and Economic Costs. **The American Journal of Medicine**. v. 113, 2002a.

FOXMAN, B.; BARLOW, R.; D'ARCY, H.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J. D. Urinary Tract Infection: Self-Reported Incidence and Associated Costs. **AEP**. v. 10, n. 8, p. 509-515, 2000.

FOXMAN, B.; MANNING, S. D.; TALLMAN, P.; BAUER, R., ZHANG, L.; KOOPMAN, J. S.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J. D.; MARRS, C. F. Uropathogenic *Escherichia coli* Are More Likely than Commensal *E. coli* to Be Shared between Heterosexual Sex Partners. **American Journal of Epidemiology**. v. 156, p. 1133-1140, 2002b.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: Focus on infection. **American Journal of Epidemiology**. v. 153, n. 12, 2001.

FRANCE, A. M.; KUGELER, K. M.; FREEMAN, A.; ZALEWSKI, C. A.; BLAHNA, M.; ZHANG, L.; MARRS, C. F.; FOXMAN, B. Clonal Groups and the Spread of Resistance to

Trimethoprim-Sulfamethoxazole in Uropathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p.1101–7, 2005.

FURUYA, E. Y.; LOWY, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature Reviews**. v. 4, p. 36-46, 2006.

GOETTSCH, W.; PELT, W. VAN.; NAGELKERKE, N.; HENDRIX, M. G.; BUITING, A. G.; PETIT, P. L.; SABBE, L. J.; GRIETHUYSEN, A. J.; NEELING, A. J. de. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 46, p. 223–228, 2000.

GUPTA K. Addressing antibiotic resistance. **American Journal of Medicine**. v. 113, p. 29-34, 2002.

GUPTA, K.; HOOTON, T. M; STAMM, W. E. 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.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 49, n. 1, p. 109-16, 2003.

HOA, P.; RIVER, C. W.; WONGB, K.; YIPA, K.; LOKEC, S.; LEUNG, M. S. T.; MAK, G. C.; FRANKIE, K.H.; CHOWA, K.; KENNETH, W.T.; TSANGA, T. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates from women: emerging multidrug resistance phenotypes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 59, p. 439–445, 2007.

HOOTON, T. M. The current management strategies for community-acquired urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 17, p. 303–332, 2003.

HOOTON, T. M.; BESSER, R.; FOXMAN, B.; FRITSCH, T. R.; NICOLLE, L. E. Acute Uncomplicated Cystitis in an Era of Increasing Antibiotic Resistance: A Proposed Approach to Empirical Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p.75–80, 2004.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 295, p. 383–404, 2005.

KAHLMETER, G.; MENDAY, P.; CARS, O. Non-hospital antimicrobial usage and resistance in community-acquired *Escherichia coli* urinary tract infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, p. 1005–1010, 2003.

KARLOWSKYA, J. A.; KASLOFF, S.; NICHOLA, K. A.; HOBANA, D. J.; ZHANEL. G. G. Genetic relatedness of multidrug-resistant *Escherichia coli* cultured from geographically diverse outpatient, midstream urine specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 58, p.283–287, 2007.

KASS, E. H; FINLAND, M. Asymptomatic Infections of the Urinary Tract. **The Journal of Urology**. v. 167, p.1016-1020, 1956.

KIFFER, C. R.; MENDES, C.; OPLUSTIL, P. C.; SAMPAIO, J. L. Antibiotic Resistance and Trend of Urinary Pathogens in General Outpatients from a Major Urban City. **International Brazilian Journal of Urology**. v. 33(1), p. 42-49, 2007.

KOCK, R. C.; RIBEIRO, J. C.; SCHNOR, O. H.; ZIMMERMANN, B. S.; MULLER, F. M.; AGOSTIN, J. MACHADO, V.; ZHANG, L. Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41(3), p. 277-281, 2008.

LE, T. P.; MILLER, L. G. Empirical Therapy for Uncomplicated Urinary Tract Infections in an Era of Increasing Antimicrobial Resistance: A Decision and Cost Analysis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 33, p. 615 – 21, 2001.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A. et al. Multidrug Resistance among Enterobacteriaceae Is Strongly Associated with the Presence of Integrons and Is Independent of Species or Isolate Origin. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 187, p. 251–9, 2003.

LIVERMORE, D. M.; JAMES, D.; REACHER, M.; GRAHAM, C.; NICHOLS, T.; STEPHENS, P.; Johnson, A. P.; George, R. C. Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in *Enterobacteriaceae* from bacteremias, England and Wales, 1990–1999. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, p. 473–478, 2002.

MACDOUGALL, C.; POWELL, J. P.; JOHNSON, C. K.; EDMOND, M. B.; POLK, R. E. Hospital and community fluoroquinolone use and resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in 17 US hospitals. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 435–440, 2005.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R.; FOXMAN, B. F.; O'BRYAN, T. T.; FULLERTON, K. E.; RILEY, L. W. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multi-drug resistant *Escherichia coli* clonal group. **New England Journal of Medicine**. v. 345, p.1007–13, 2001.

MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: Application of contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**. v. 17, p. 153-164, 1993.

MCISSAC, W. J.; MAZZULLI, T.; PERMAUL, J.; MOINEDDIN, R.; LOW, D. E. Community-acquired antibiotic resistance in urinary isolates from adult women in Canada. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**. v. 17, n. 6, 2006.

MONIRI, R.; KHORSHIDI, A.; AKBARI, H. Emergence of Multidrug Resistant Strains of *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections. **Iranian Journal of Public Health**, v. 32, n. 4, p.42-46, 2003.

MURRAY, B. E.; MATHEWSON, J. J.; DUPONT, H.; ERICSSON, C. D.; REVES, R. R. Emergence of resistant fecal *Escherichia coli* in travelers not taking prophylactic antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 34, p.515–8, 1990.

NABER, K. G.; BISHOP, M.C.; BJERKLUND-JOHANSEN, T.E.; BOTTO, H.; ÇEK, M.; GRABE, M.; LOBEL, M.; PALOU, J.; TENKE, P. Guidelines on The Management of Urinary and Male Genital Tract Infections. **European Association of Urology**, 2006.

NABER, K. G.; SCHITO, G.; BOTTO, H.; PALOU, J.; MAZZE, T. Surveillance Study in Europe and Brazil on Clinical Aspects and Antimicrobial Resistance Epidemiology in Females with Cystitis (ARESC): Implications for Empiric Therapy. **European Urology**, 2008.

NYS, S.; TERPORTEN, P. H.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; STOBBERINGH, E. E. et al. Trends in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urology services in The Netherlands (1998–2005). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.126–132, 2008.

OLESEN, B.; KOLMOS, H.J.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Cluster of multiresistant *Escherichia coli* O78:H10 in Greater Copenhagen. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases** . v. 26, p. 406–10, 1994.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA based-typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 6, p. 1661–1669, 1999.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 28–52, 2004.

PHILLIPS, I.; EYKYN, S.; KING, A.; GRANSSEN, W. R.; ROWE, B.; FROST, J. A., et al. Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth Health District. **Lancet**. v.1, p.1038–41, 1988.

PIRES, M. C. S.; FROTA, K. S.; MARTINS JÚNIOR, P. O.; CORREIA, A. F.; ESCALANTE, J. J. C.; SILVEIRA, C. A. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40 (6), p. 643-647, 2007.

PITOUT, J. D. D.; GREGSON, D. B.; CHURCH, D. L.; ELSAYED, S.; LAUPLAND, K. B. Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary Health Region. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 2844–9, 2005.

RAKA, L.; MULLIQI-OSMANI, G.; BERISHA, L.; BEGOLLI, L.; OMERAGIQ, S.; PARSONS, L.; SALFINGER, M.; JAKA, A.; KURTI, A.; JAKUPI, X. Etiology and

susceptibility of urinary tract isolates in Kosova. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 23, n. 1, 2004.

RAMCHANDANI, M. MANGES, A. R.; DEBROY, C.; SMITH, S. P.; JOHNSON, J. R.; RILEY, L. W. Possible Animal Origin of Human-Associated, Multidrug-Resistant, Uropathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Infection Disease**. v. 40, p. 251-7, 2005.

ROCK, W.; COLODNER, R.; CHAZAN, B.; ELIAS, M.; RAZ, R. Ten Years Surveillance of Antimicrobial Susceptibility of Community-Acquired *Escherichia coli* and Other Uropathogens in Northern Israel (1995–2005). **IAMJ**. p. 803 – 805, 2007.

SAHM, D. F.; THORNSBERRY, C.; MAYFIELD, D. C.; JONES, M. E.; KARLOWSKY, J. A. Multidrug-Resistant Urinary Tract Isolates of *Escherichia coli*: Prevalence and Patient Demographics in the United States in 2000. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 5, 2001.

SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**. v. 12, p.412–416, 2004.

SCHITO, G. C.; NABER, K. G.; BOTTO, H.; PALOU, J.; MAZZEI, T.; GUALCO, L.; MARCHESE, A. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 34, p. 407 – 413, 2009.

SMITH, S. P.; MANGES, A. R.; RILEY, L. W. Temporal changes in the prevalence of community-acquired antimicrobial-resistant urinary tract infection affected by *Escherichia coli* clonal group composition. **Clinical Infectious Diseases**. v. 46, p.689–695, 2008.

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*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 1347-1351, 2006.

STAMM, W. E. Infecções do Trato Urinário e pielonefrite. In: HARRISON, T. R.; BRAUNWALD, E. **Harrison Medicina Interna**. 15. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2002. cap. 280.

STRATCHOUNSKIM, L. S.; RAFALSKI, V. V. Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from adult patients with uncomplicated community-acquired urinary tract infections in the Russian Federation: two multicentre studies, UTIAP-1 and UTIAP-2. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 28, p.4-9, 2006.

STRUELENS, M.J. et al. Consensus guideline for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 2, n. 1, 1996.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology** v. 33, p. 2233-9, 1995

THOMPSON JR, R. B.; MILLER, M. Specimen Collection, transport, and processing: Bacteriology. In:_____. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington, D.C (Eds). American Society for microbiology, 2003. p 320-32.

TODD, J.; ARMON, C.; GRIGGS, A.; POOLE, S.; BERMAN, S. Increased Rates of Morbidity, Mortality, and Charges for Hospitalized Children With Public or No Health Insurance as Compared With Children With Private Insurance in Colorado and the United States. **Pediatrics**. v. 118, n. 2, 2006.

UCHIDA, Y.; MOCHIMARU, T.; MOROKUMA, Y.; KIYOSUKE, M.; FUJISE, M.; ETO, F.; HARADA, Y. KADOWAKI, M.; SHIMONO, N.; KANG, D. Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 35, p.387–391, 2010.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 13, p. 1–46, 2007.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 14, 327–335, 2000.

VINCENT, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DOZOIS, C. M.; DUTIL, L.; GALANAKIS, C.; REID-SMITH, R. J.; TELLIER, P.; TELLIS, P. A.; ZIEBELL, K.; MANGES, A. R. Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, n. 1, 2010.

WARREN, J. W.; ABRUTYN, E.; HEBEL, J. R.; JOHNSON, J. R.; SCHAEFFER, A. J.; STAMM, W. E. Guidelines for Antimicrobial Treatment of Uncomplicated Acute Bacterial Cystitis and Acute Pyelonephritis in Women. **Clinical Infectious Diseases**. v. 29, p. 745–58, 1999.

WILSON, M. L.; GAIDO, L. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections in Adult Patients. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38, p. 1150-8, 2004.

YAN, Z.; SHEN, D.; CAO, J. R.; CHEN, R.; WEI, X.; LIU, L.; XU, X. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 35, p. 269–273, 2010.