

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

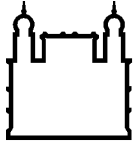
Doutorado / Programa de Pós-Graduação
em Medicina Tropical

Caracterização fenotípica e genética de *Escherichia coli* de origem
urinária resistente aos antibióticos, isolados em Quito, Equador.

CARLOS VINICIO CHILUISA GUACHO

Rio de Janeiro

Novembro, 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Carlos Vinicio Chiluisa Guacho

Caracterização fenotípica e genética de *Escherichia coli* de origem urinária resistente aos antibióticos, isolados em Quito, Equador.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr^a. Marise Dutra Asensi

RIO DE JANEIRO

Novembro, 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

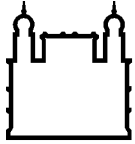
C538 Chiluisa Guacho, Carlos Vinicio

Caracterização fenotípica e genética de *Escherichia coli* de origem urinária resistente aos antibióticos, isolados em Quito, Equador / Carlos Vinicio Chiluisa Guacho. – Rio de Janeiro, 2016.
xix, 98 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2016.
Bibliografia: f. 78-96

1. *Escherichia coli*. 2. Resistência. 3. β -lactâmicos. 4. Aminoglicosídeos. 5. Fluoroquinolonas. 6. Tipagem molecular. I. Título.

CDD 579.342



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: CARLOS VINICIO CHILUISA GUACHO

Caracterização fenotípica e genética de *Escherichia coli* de origem urinária resistente aos antibióticos, isolados em Quito, Equador.

ORIENTADORA: Prof. Dr^a Marise Dutra Asensi

Aprovada em: 16/Novembro/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. David Barroso, **Presidente.** Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

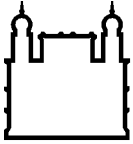
Prof. Dr. Javier Escobar Pérez Universidad El Bosque, Bogotá – Colombia.

Prof. Dra. Cristiane Lamas Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / Fiocruz

Prof. Dr. Filipe Carvalho-Costa Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Prof. Dr. Célia Maria Carvalho Araújo Pereira Romão Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fiocruz

Rio de Janeiro, 16 de novembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Carlos Vinicio Chiluisa Guacho**, sob orientação da Dr^a. Marise Dutra Asensi. Ao décimo sexto dia do mês de novembro de dois mil e dezesseis, realizou-se às nove horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: "**Caracterização fenotípica e genética de *Escherichia coli* de origem urinário resistentes a antibióticos, isolados em Quito, Equador**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina - área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias, na linha de pesquisa: Infecções e Doenças produzidas por Bactérias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. David Eduardo Barroso - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Javier Antonio Escobar Pérez - Universidad El Bosque/Colômbia; Dr^a. Cristiane da Cruz Lamas - INI/FIOCRUZ; Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão - INCQS/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza - IOC/FIOCRUZ e Dr. Fábio Aguiar Alves – UFF/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Medicina está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 16 de novembro de 2016.

Dr. David Eduardo Barroso (Presidente da Banca):

Dr. Javier Antonio Escobar Pérez (Membro da Banca):

Dr^a. Cristiane da Cruz Lamas (Membro da Banca):

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Membro da Banca):

Dr^a. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Membro da Banca):

Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenador do Programa):

Martha C. Suárez-Mutis
SIAPE 1556044
COORDENADORA DE MEDICINA TROPICAL
IOC

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimentoseac@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

Aos meus pais, Ramón Chiluisa e María Celia Guacho, por todo o grande amor e ensinamentos recibidos.

Aos meus irmãos Alicia e Edison Chiluisa, por todo o carinho e por sempre apoiar-me em minhas decisões.

À meus sobrinhos, Alisson Quiligana e Andrés Romero, por que sempre estão para dar-me carinho.

À meus Filhos Ariana, Alejandro e Alexis, razão de todas minhas conquistas, razão de toda minha vida e são o incentivo mais grande para voltar rapidamente a minha casa.

*À minha Esposa Mayra Ruiz, Meu grande amor,
amiga, companheira, amante da minha vida,
agradeço ela pela compreensão durante minhas
longas ausências.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos derramadas para chegar até aqui, manter a minha família junta, e permitir-me voltar a minha casa.

À minha orientadora, Professora Dr^a. Marise Dutra Asensi, por ter me recebido em seu laboratório, por sua disponibilidade e por seus valiosos ensinamentos e, sobretudo pela paciência durante todos esses anos. Agradeço ainda por todo seu apoio e empenho no desenvolvimento deste estudo.

À Professora Dr^a. Viviane Zahner, pelo apoio durante a minha iniciação nas técnicas moleculares. Agradeço particularmente, seus constantes e valiosos conselhos científicos.

À Dra. Liliane Miyuki Seki, agradeço pelo apoio na realização dos testes bioquímicos para a identificação bacteriana e na realização do experimento de electroforesis de campo pulsado.

À professora Dr^a. Martha Suarez Mutis e seu esposo Eduardo Pires, por ter me recebido na sua casa nos primeiros dias da minha chegada ao Rio de Janeiro, e ter me apoiado nos inícios dos meus estudos no Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Ao Professor Javier Escobar Perez, do Laboratorio de Genética Molecular da Universidade El Bosque, na cidade de Bogotá Colombia, por ter-me ajudado na realização do MLST pela metodologia de Atchman, desenvolvendo um dos meus objetivos da tese.

Aos professores da Pós-graduação de Medicina Tropical que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

À Livia Mangeon, da secretaria da Post-Graduação de Medicina Tropical por sempre ter sido paciente e pela atenção dada aos alunos.

Aos membros da banca que enobrecerem este trabalho

Aos meus colegas e grandes amigos da pós-graduação em Medicina Tropical que compartilharam aulas e experiências na minha estadia na FIOCRUZ e na cidade e Rio de Janeiro.

Aos meus amigos da bancada do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – LAPIH do IOC, Fiocruz, que compartilharam dia a dia suas experiências durante a realização dos meus experimentos.

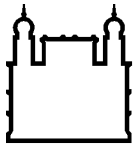
Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

*"El futuro tiene muchos nombres,
para los débiles es lo inalcanzable,
para los temerosos, lo desconocido, y
para los valientes es la oportunidad."*

(Hugo, Victor)

*"Mira que te mando
a que te esfuerces y seas valiente,
no temas ni desmayes,
que yo, tu Dios,
estaré siempre a tu lado"*

(Josué 1,9)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

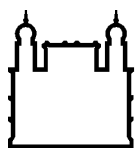
TÍTULO.

Caracterização fenotípica e genética de *Escherichia coli* de origem urinária resistente aos antibióticos, isolados em Quito, Equador.

RESUMO

Escherichia coli é o principal agente causador das infecções urinárias de origem comunitária e hospitalar, frequentemente associado à multirresistência antibiótica. O objetivo do presente estudo foi a caracterização genética de *Escherichia coli* uropatogênica com perfil de resistência fenotípica aos antibióticos betalactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, procurando o clone pandêmico ST131, em 156 amostras de origem comunitária e hospitalar isolados na cidade de Quito, Equador, no período janeiro a dezembro de 2011. O perfil de resistência foi determinado através de difusão em ágar, para a detecção fenotípica de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) usando o método de disco de aproximação (Jarlier) em Ágar Muller Hinton e as recomendações do CLSI 2013, adicionando-se ceftazidima para detecção de β -lactamases tipo AmpC. A detecção genotípica de resistência foi realizada através de PCR e sequenciamento, e a similaridade clonal por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Os resultados da resistência fenotípica foram, Amoxicilina/ácido clavulânico 32,6% (51/79), ampicilina 87,8% (137/156), aztreonam 14,7% (23/156), cefalotina 48,1%(75/156), ceftazidima 7,6%(12/156), cefepima 7,7% (12/156), cefotaxima 19,2% (30/156), ceftazidima 12,5% (20/156), ciprofloxacina 50,6% (79/156), gentamicina 21,7% (35/156), amicacina 5,7% (9/156), trimetoprim/sulfametoxazole 77,5% (121/156), salientando que todas as amostras foram 100% suscetíveis para ertapenem. Enquanto à produção de ESBL, 22,4% (35/156) dos isolados foram produtores. Na análise genética, os genes ESBL caracterizados foram: *bla*_{CTX-M} 60% (21/35) (dezessete CTX-M-15, três CTX-M-14 e um CTX-M-2), *bla*_{SHV} 68,6% (2/35), *bla*_{TEM} 37,1% (13/35) e *bla*_{AmpC} 11,4% (4/35, variante CMY-2). Na resistência às fluoroquinolonas, os genes caracterizados foram *aac(6')-Ib-cr* 54,4% (43/79) e o gene *qnrB19* 60,8% (48/79); e na resistência para os aminoglicosídeos, os genes encontrados foram *aac(6')-Ib* 74,3% (29/39), *aac(3')-IIa* 71,7% (28/39) e o gene *ant(2'')-Ia* em 5,1% (2/39). Finalmente, a tipagem genotípica por PFGE demonstrou o grande polimorfismo genético nas cepas estudadas e, o MLST por Atchman identificou o clone ST131-B2 de *E. coli* produtor de CTX-M-15 em todos os ST43 identificados pelo Instituto Pasteur. Concluindo, este estudo demonstra o alto grau de resistência para os antibióticos de primeira escolha no tratamento empírico das infecções do trato urinário, e a disseminação de genes de resistência e clones patogênicos como ST131-B2 *E. coli* nos ambientes comunitários e hospitalares.

Palavras-Chave: *Escherichia coli*, Resistência, β -lactâmicos. Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas, Tipagem Molecular.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

TITLE

Phenotypic and genetic characterization *Escherichia coli* of urinary origin resistant to antibiotics, isolated in Quito, Ecuador.

ABSTRACT

Escherichia coli is the main causative agent of urinary tract infection in community and hospital settings and frequently associated with antibiotic multiresistance. The aim of this study was analyse the genetic characterization of uropathogenic *E. coli* with phenotypic resistance profile to antibiotics beta-lactam, fluoroquinolones and aminoglycosides, searching for clone ST131 pandemic, in 156 samples of community and nosocomial isolates in Quito, Ecuador, from January to December 2011. The resistance profile was determined by disk diffusion agar. The phenotypic detection of β -lactamase extended-spectrum (ESBLs) was performed using disk-approximation method (Jarlier) in Mueller Hinton Agar, according to recommendations CLSI 2013. A disk of ceftazidime was used for the detection of β -lactamase AmpC type. Genetic detection of resistance was performed by PCR and sequencing, and for clonal similarity for *Multilocus Sequence Typing* (MLST) and *Pulsed Field gel Electrophoresis* (PFGE). The results of phenotypic resistance were: amoxicillin-clavulanic acid 32,6% (51/79), ampicillin 87,8% (137/156), aztreonam 14,7% (23/156), cefalothin 48,1% (75/156), ceftazidime 7,6% (12/156), cefepime 7,7% (12/156), cefotaxime 19,2% (30/156), ceftazidime 12,5% (20/156), ciprofloxacin 50,6% (79/156), gentamicin 21,7% (35/156), amikacin 5,7% (9/156), trimetoprim-sulphamethoxazole 77,5% (121/156), and all samples were 100% susceptible to ertapenem. While ESBL production, 22.4% (35/156) of the isolates were producers. The genetic analysis showed that the ESBL genes were: *bla*_{CTX-M} 60% (21/35), (seventeen CTX-M-15, three CTX-M-14, and one CTX-M-2), *bla*_{SHV} 68.6% (2/35), *bla*_{TEM} 37,1% (13/35) and *bla*_{AmpC} 11,4% (4/35, CMY-2-type). The resistance genes for fluoroquinolones were *aac(6')-Ib-cr* 54.4% (43/79) and the gene *qnrB19* 60.8% (48/79), resistance genes for aminoglycoside were *aac(6')-Ib* 74.3%(29/39), *aac(3')-IIa* 71.7%(28/39) and the gene *ant(2'')-Ia* in 5.1% (2/39). Finally, the genotypic typing by PFGE showed the great genetic polymorphism in the studied strains. MLST Atchman scheme confirms the presence of the pandemic clone ST131-B2 *Escherichia coli* CTX-M-15-producing in all ST43 isolates obtained by the Institute Pasteur scheme. In conclusion, this study demonstrate the high level of resistance to antibiotics of first choice for the empirical treatment of urinary tract infections, and the spread of resistance genes and pathogenic clones as ST131-B2 *E. coli* in the community and hospital settings.

Keywords: *Escherichia coli*, Resistance, Beta-lactams, Aminoglycosides, Fluoroquinolones, Molecular Typing

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Infecções do trato urinário (ITU).....	1
1.1.1 Epidemiologia	1
1.1.2 Classificação das Infecções do Trato Urinário.....	2
1.1.3 Etiologia e Diagnóstico das ITUs.....	3
1.2 <i>Escherichia coli</i>	5
1.2.1 Classificação de <i>Escherichia coli</i>	5
1.2.2 Filogenia em populações bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	6
1.2.3 Fatores de virulência de <i>E. coli</i> uropatogênica.....	8
1.3 Resistência bacteriana.....	9
1.3.1 Mecanismos de Resistência.....	10
1.3.2 Disseminação dos genes de resistência.....	10
1.3.3 Integrons.....	11
1.4 Resistência aos antibióticos β -lactâmicos.....	12
1.4.1 Enzimas β -lactamases	13
1.4.2 Classificação das β -lactamases.....	13
1.4.2.1 β -Lactamases de Espectro Estendido, tipo AmpC.....	15
1.4.2.2 β -Lactamases de Espectro Estendido, tipo SHV.....	15
1.4.2.3 β -Lactamases de Espectro Estendido, tipo TEM	16
1.4.2.4 β -Lactamases de Espectro Estendido, tipo CTX-M	16
1.5 Resistência às fluoroquinolonas	19
1.5.1 Mecanismos de resistência de origem cromossômico.....	20
1.5.2 Mecanismos de resistência plasmídeos.....	20
1.5.2.1 Gene <i>qnr</i> , Proteção do alvo.....	20
1.5.2.2 Gene <i>aac(6')-Ib-cr</i> , inativação do antibiótico.....	21
1.6 Resistência aos aminoglicosídeos.....	21
1.6.1 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs).....	22
1.6.2 Acetiltransferases (AACs).....	22
1.7 Tipagem molecular.....	23
1.7.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	23
1.7.2 Multilocus Sequence Typing (MLST).....	24
1.8 Justificativa	24

2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral.....	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Tipo de estudo.....	28
3.2	Coleta e transporte das amostras.....	28
3.3	Identificação de <i>Escherichia coli</i>	29
3.4	Seleção das amostras	30
3.5	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	30
3.6	Detecção fenotípica de ESBL e AmpC.....	32
3.7	Quantificação da concentração inibitória mínima (CIM).....	33
3.8	Extração e quantificação de DNA.....	34
3.9	Reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	35
3.9.1	Classificação filogenética.....	35
3.9.2	Detecção de <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	35
3.9.3	Detecção de <i>bla</i> _{AMPC}	37
3.9.4	Detecção do gene <i>aac(6')-Ib-cr</i>	39
3.9.5	Detecção do gene <i>qnr</i>	39
3.9.6	Detecção dos genes <i>aac(3')-IIa</i> , <i>ant(2'')-Ia</i>	40
3.9.7	Detecção das 16S rRNA metilases	41
3.9.8	Detecção do Integron classe 1.....	41
3.9.9	Electroforese em gel de agarose.....	42
3.10	Tipagem molecular para caracterização de <i>E. coli</i>	43
3.10.1	Análise do polimorfismo do DNA genômico (PFGE).....	43
3.10.2	Multilocus sequence typing (MLST).....	44
3.11	Considerações éticas	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Análises de dados dos pacientes.....	46
4.2	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	46
4.3	Detecção fenotípica de ESBL e AmpC.....	48
4.4	Concentração Inibitória Mínima- CIM.....	50
4.5	Detecção dos determinantes genéticos de resistência.....	50
4.5.1	Determinantes genéticos das β -lactamases.....	50

4.5.2	Determinantes genéticos de resistência à ciprofloxacina.....	51
4.5.3	Determinantes de resistência aos aminoglicosídeos.....	52
4.5.4	Detecção do integron de classe 1.....	53
4.6	Caracterização genética de <i>E. coli</i>	55
4.6.1	Classificação filogenética de <i>E. coli</i>	55
4.6.2	Análise do polimorfismo do DNA genômico.....	57
4.6.3	Multilocus sequence typing (MLST).....	62
4.6.3.1	Clone ST-131-B2 <i>E coli</i> produtor de CTX-M-15.....	64
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÕES	75
7	PERSPECTIVAS	77
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
9	APÊNDICES E/OU ANEXOS	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Locais de colonização de <i>E. coli</i> patogênica.....	6
Figura 1.2	Patotipos de <i>E. coli</i> e filogenéticos	7
Figura 1.3	Árvore da classificação dos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> na presença e ausência dos genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e do fragmento <i>TspE4.C2</i>	8
Figura 1.4	Representação ilustrada da transferência horizontal de genes	11
Figura 1.5	Estrutura do integron	12
Figura 1.6	Distribuição mundial dos genótipos CTX-M	18
Figura 1.7	Distribuição mundial do clone <i>E. coli</i> ST-131-CTX-M-15	19
Figura 3.1	Morfologia das colônias de <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 3.2	Testes bioquímicos de identificação de <i>E. coli</i>	30
Figura 3.3	Antibiograma realizado pelo método de disco difusão em ágar.....	32
Figura 3.4	Detecção fenotípica de: ESBL (A) e AmpC (B).....	33
Figura 3.5	Avaliação do CIM para cefotaxima (CT) e ceftazidima (TZ)	34
Figura 4.1	Amplificação de DNA na região variável do integron classe 1.....	53
Figura 4.2	Gel com perfis de eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	58
Figura 4.3	Dendrograma dos 39 isolados de <i>E. coli</i> resistente aos aminoglicosídeos.....	59
Figura 4.4	Dendrograma dos 79 isolados de <i>E. coli</i> resistente à ciprofloxacina.....	60
Figura 4.5	Dendrograma de <i>E.coli</i> uropatogênicas produtoras de β -lactamases.....	61
Figura 4.6	Diagrama por e-Burst V3 dos STs descritos pelo Instituto Pasteur.....	63
Figura 4.7	Complexo Clonal 2 (CC2) obtido pelo Instituto Pasteur	64
Figura 4.8	Determinantes genéticos de resistência do clone ST131 de <i>E. coli</i> de origem urinária.....	65

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1	Percentagens de resistência nas cepas produtoras de ESBL.....	49
Gráfico 4.2	Classificação dos grupos filogenéticos de E. coli.....	56

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1	Percentual de agentes causadores das ITU complicadas.....	4
Quadro 1.2	Percentual de agentes causadores das ITU não complicada...	4
Quadro 1.3	Exemplos de resistência natural das bactérias aos antibiótico..	10
Quadro 1.4	Classificação das β -lactamases	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Antibióticos utilizados no teste de sensibilidade	31
Tabela 3.2	Halos de inibição sugestivos de ESBL para <i>E. coli</i> (CLSI, 2013).....	32
Tabela 3.3	Critérios para a concentração inibitória mínima, CLSI 2013.....	34
Tabela 3.4	Iniciadores utilizados na classificação filogenética de <i>E. coli</i>	36
Tabela 3.5	Iniciadores utilizados nas reações de PCR para β -lactamases tipo ESBL.....	37
Tabela 3.6	Condições de PCR para amplificação dos genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> CTX-M-15	37
Tabela 3.7	Iniciadores das reações de PCR para β -lactamases tipo AmpC	38
Tabela 3.8	Iniciadores utilizados na amplificação de <i>aac(6')-Ib-cr</i>	39
Tabela 3.9	Iniciadores utilizados nas reações de PCR para genes <i>qnr</i>	40
Tabela 3.10	Iniciadores utilizados nas reações de PCR para <i>aac(3)-IIa</i> , <i>ant(2'')-Ia</i>	40
Tabela 3.11	Iniciadores utilizados nas reações dos genes 16S-rRNA.....	41
Tabela 3.12	Iniciadores utilizados nas reações para integron de classe 1.....	42
Tabela 4.1	Distribuição das 36 amostras de origem hospitalar.....	46
Tabela 4.2	Frequência de resistência antibiótica nos hospitais e na comunidade.....	47
Tabela 4.3	Perfil de corresponsabilidade aos antibióticos na comunidade e hospital.....	48
Tabela 4.4	Frequência fenotípica das β -lactamases nos hospitais e comunidade.....	49
Tabela 4.5	Resultados da CIM dos isolados resistentes aos antibióticos testados.....	50
Tabela 4.6	Distribuição genotípica da β -lactamases pela origem	51
Tabela 4.7	Resultados de sequenciamento <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> Amp.....	51

Tabela 4.8	Determinantes de resistência genética à ciprofloxacina.....	52
Tabela 4.9	Determinantes de resistência genética aos aminoglicosídeos....	53
Tabela 4.10	Genes na região variável do Integron classe1.....	54
Tabela 4.11	Perfis de correlação dos grupos de determinantes de resistência genética.....	55
Tabela 4.12	Relação do perfil dos determinantes de resistência genética com os grupos filogenéticos.....	57
Tabela 4.13	Complexos clonais de <i>E. coli</i> por MLST – Instituto Pasteur.....	62
Tabela 4.14	Relação do complexo clonal CC2 – Instituto Pasteur	63
Tabela 4.15	Perfil alélico dos dois esquemas do MLST.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM	Ampicilina
AK	Amicacina
AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
ATCC	Coleção Americana de Culturas Tipo (tradução do inglês de <i>American Type Culture Collection</i>)
ATM	Aztreonam
<i>bla</i>	Gene β -lactamases
CAZ	Ceftazidima
CF	Cefalotina
<i>chuA</i>	receptor de membrana externa de hemina
CIP	Ciprofloxacina
CLA	Ácido clavulânico
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (tradução do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CIM	Concentração inibitória mínima
CN	Gentamicina
CNF-1	Fator necrotizante tipo I
CTX	Cefotaxima
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreogênica
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EMAs	Ezimas modificadoras de aminoglicosídeos
EMB	agar eosina azul de metileno
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América

ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
IM	Intramuscular
ITU	Infecção do trato urinário
IV	Intravenoso
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MUG	4-metilumbeliferil-β-D-glucuronide
NaCl	Cloreto de sódio
NMEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de meningite neonatal
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONPG	O-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
PAIs	Ilhas de patogenicidade
PBP	Proteína fixadora de penicilina
PCR	Reação da polimerase em cadeia (tradução do inglês de <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Eletroforese em campo pulsado (tradução do inglês de <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
PMQR	Determinantes de resistência às quinolonas por plasmídeos (tradução do inglês <i>Plasmid-Mediated Quinolone Resistance</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
SAT	Toxina secretora autotransportadora
SDS	Dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio
SIM	Sulfato/Indol/Motilidade
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprim
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TE	Tampão tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	Caldo de soja tríptica
TSI	Agar tríplice açúcar-ferro
<i>TSPE4.C2</i>	Fragmento de DNA anônimo
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólico
TZ	Ceftazidima

TZB	Tazobactam
UFC	Unidade formadora de colônias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UV	Luz ultravioleta
VO	Via oral
<i>yjaA</i>	Proteínas não caracterizadas no genoma de <i>Escherichia coli</i> K-12
%	porcentagem
°C	grau Celsius ou centígrado
µg	micrograma
µL	microlitro
cm	centímetro
Kb	kilobase
L	litro
M	molar
Mb	megabase
mM	milimolar
mg	miligrama
mL	mililitro
nº	número
pb	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
UN	unidade

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções do trato urinário (ITU)

A infecção do trato urinário (ITU) consiste na colonização e multiplicação de microrganismos no tecido de qualquer estrutura do aparelho urinário, geralmente na parte inferior e associada à infecção por bactérias, principalmente as Gram negativas do trato entérico, podendo estar acompanhada de bacteriúria e piúria (POLETTO & REIS 2005). O termo “bacteriúria” se define como a presença de bactérias na urina, em quantidade maior ou igual a 10^5 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Já a “piúria” é definida como a presença de células brancas de defesa do hospedeiro, e.g., leucócitos, na urina. A presença destes dois parâmetros laboratoriais na análise de urina de um paciente com história clínica de disúria, polaciúria, urgência miccional, dor abdominal baixa e/ou lombar associada ou não à resposta inflamatória sistêmica, deve indicar ITU. Temos também o conceito de “bacteriúria assintomática”, que é a presença de bactérias na urina com contagem maior ou igual a 10^5 UFC/mL (cultura positiva) em pacientes sem sintomas associados à ITU, sendo este padrão clínico característico de algumas doenças, grupos etários e de certas condições fisiológicas, como por exemplo a gravidez (CHUNG et al. 2010).

1.1.1 Epidemiologia

A ITU é a infecção mais comum, perde apenas para as infecções respiratórias e gastrintestinais, além de despontar também como a infecção de maior ocorrência em pacientes hospitalizados (NAJAR et al. 2009). No Brasil, cerca de 80% das consultas clínicas devem-se à ITU, principalmente por cistite, que é mais frequente em mulheres (POLETTO & REIS 2005).

As ITUs são observadas em todas as faixas etárias. Na infância, são mais frequentes abaixo dos seis meses no sexo masculino e acima dos seis meses no sexo feminino (BIASSONI & CHIPPINGTON 2008, MEKITARIAN & CARVALHO 2015). Estima-se que 8% das meninas e 2% dos meninos desenvolvem ao menos um episódio de infecção urinária durante a infância (MOHKAM et al. 2008). Em geral, a incidência da ITU na infância varia de acordo com a idade e sexo, com incidência acumulativa de 1,8% em meninos e 6,6% em meninas até os cinco anos,

ressaltando que, durante o primeiro ano, a incidência em meninos e meninas é igual a 4,2%, diminuindo até 0,8% nos meninos e permanecendo nessa faixa durante os anos seguintes. As ITUs reincidentem na adolescência, com o início da atividade sexual, com predominância no sexo feminino (ALAMO-SOLIS 2000).

Na idade adulta, o sexo feminino é o mais vulnerável para ocorrência de ITU. Aproximadamente 60% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de ITU em suas vidas, com maior prevalência nas mulheres sexualmente ativas (HOOTON et al. 2004, JARBAS et al. 2010). Durante o período gestacional, 2 a 7% das mulheres apresentam ITU em alguma etapa da gravidez ou ITU recorrentes durante todo o período gestacional. Além disso, 17 a 20% das mulheres grávidas apresentam bacteriúria assintomática, com maior frequência no segundo trimestre da gravidez, sendo o mais frequente a pielonefrite aguda, o que leva ao aumento da morbidade na gestante com risco de parto prematuro (VALLEJOS et al. 2010). Na população idosa, a ITU é a segunda maior causa de infecção, e apresenta bacteriúria assintomática em 50% das mulheres e 30% dos homens (FOXMAN 2002). Nesta faixa etária, a ITU pode aparecer como uma complicação decorrente do dano fisiológico do aparelho urinário devido à cirurgia prévia, anomalia anatômica ou doença neurológica (NICOLLE 2001, MAGLIANO et al. 2012).

1.1.2 Classificação das Infecções do Trato Urinário

A infecção urinária é classificada tradicionalmente de acordo o sítio de infecção e nível de gravidade. De acordo com o sítio de infecção se classifica em infecção do trato urinário inferior, envolvendo bexiga (cistite), uretra (uretrite) ou próstata (prostatite) e infecções do trato urinário superior, acometendo os ureteres ou o parênquima renal, causando pielonefrite. De acordo com o grau de severidade, podem ser divididas em ITUs complicadas ou não complicadas.

A ITU não complicada ocorre em pacientes saudáveis com função normal do aparelho urinário. Os patógenos geralmente são susceptíveis aos antimicrobianos e são erradicados por uma terapia empírica de baixo custo. Este tipo de infecção urinária pode ser encontrado nas seguintes situações: mulher não grávida, ausência de alterações anatômicas do trato urinário, ausência de alterações funcionais do trato urinário, ausência de cateteres urinários, ausência de alterações na imunidade,

em geral, são infecções adquiridas na comunidade (SCHAEFFER 2001, VIEIRA 2003, CHANG & SHORTLIFFE 2006)

A ITU complicada está associada a anormalidades anatômicas, funcionais ou metabólicas do trato urinário que dificultam as defesas naturais. Estas anormalidades podem ser intrínsecas, dentre elas a hiperplasia prostática benigna (anormalidade intrínseca obstrutiva), as anormalidades congênitas como bexiga neurogênica e fístulas, ou extrínsecas, associadas ao uso de cateteres ou corpos estranhos. As infecções associadas à obstrução por litíase renal são resolvidas após a correção da anormalidade (remoção do cálculo). Uma característica da ITU complicada é a grande variedade de organismos causadores, que são multirresistentes geralmente de origem hospitalar (NICOLLE 2001, SCHAEFFER 2001, VIEIRA 2003, CHANG & SHORTLIFFE, 2006).

As infecções do trato urinário podem ser classificadas em mais duas categorias. ITUs recorrentes, que são reinfecções (bactérias diferentes, sendo cada infecção um novo evento) definidas por três episódios nos últimos doze meses ou dois episódios nos últimos seis meses e, ITUs redicivantes, resultantes da persistência do mesmo agente etiológico no trato urinário, que volta a aparecer antes das duas semanas do término da terapêutica, o que sugere falha do tratamento. As ITUs recorrentes ou redicivantes ocorrem em aproximadamente 10% a 40% das mulheres (VIEIRA, 2003; VALDEVENITO 2008, WURGAFT 2010).

1.1.3 Etiologia e Diagnóstico das ITUs

As infecções clinicamente mais importantes são produzidas por bactérias. Entretanto fungos, vírus e parasitos também podem causar ITUs. Desta forma, infecções urinárias não associadas às bactérias incluem a cistite hemorrágica causada pelos adenovírus e a infecção por *Candida* nos pacientes com deficiência do sistema imunitário (ZORC et al. 2005).

Os patógenos bacterianos mais comumente causadores das ITUs pertencem à família Enterobacteriaceae. Os membros dessa família incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus mirabilis*. Entre os agentes causadores da ITU temos também as bactérias Gram-positivas como *Enterococcus* spp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo B (**Quadros 1.2 e 1.2**). Dentre estes, estima-se que a

Escherichia coli é responsável por 85% a 90% dos casos de ITUs comunitárias e por 50% dos casos de ITUs hospitalares (NICOLLE 2001, ZORC et al. 2005; NICOLLE et al. 2006, ECHEVARRÍA-ZARATE et al. 2006, WORLD HEALTH ORGANIZATION 2014, GLASER & SCHAEFFER 2015).

Quadro 1.1 Percentual de agentes causadores das ITU complicadas

Espécie	Percentual
Gram Negativos	
<i>Escherichia coli</i>	21,0 – 50,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,9 – 17,0
<i>Enterobacter</i> sp.	1,9 - 9,6
<i>Citrobacter</i> sp.	4,7 - 6,1
<i>Proteus mirabilis</i>	0,9 - 9,6
<i>Providencia</i> sp.	18,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0 – 19,0
Outros	6,1 – 20,0
Gram Positivos	
<i>Enterococcus</i> sp.	6,1 – 23,0
<i>Streptococos</i> do grupo B	1,2 - 3,5
<i>Staphylococos</i> coagulase negativo	1,4 - 3,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,9 - 2,0
<i>Candida</i> sp.	0 - 5,0

Fonte, NICOLE 2001

Quadro 1.2 Percentual de agentes causadores das ITU não complicada

Especie bacteriana	Percentual
<i>Escherichia coli</i>	91,8
<i>Klebsiella</i> sp.	3,0
<i>Enterobacter</i> sp.	0,9
<i>Proteus mirabilis</i>	2,0
<i>Citrobacter</i> sp.	0,7
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0,3
Outros	0,5

Fonte, NICOLLE et al. 2006.

No diagnóstico da ITU, consideram-se os seguintes parâmetros: presença de fatores de risco, história clínica, exame físico e testes laboratoriais onde a análise da urina e a urocultura são considerados o “padrão ouro” para o diagnóstico (ZORC et al. 2005, FOSTER 2008, WURGAFT 2010).

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à classe Proteobacteria, subclasse Gamma, família Enterobacteriaceae (STACKEBRANDT et al. 1988). É uma bactéria bacilar Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não esporulada, medindo entre 0,5 µm de diâmetro e 1-3 µm de comprimento. Apresenta flagelos peritríquios, sendo comumente móvel em meios líquidos. São indol-positivas, não utilizam citrato como fonte de carbono, não apresentam a enzima urease, possuem a enzima lisina descarboxilase, podem ou não possuir arginina e/ou ornitina descarboxilase, são fermentadoras de glicose e outros açúcares, produzem gás, são catalase positivas, oxidase negativas e reduzem nitrato a nitrito. No meio eosina-azul de metileno (EMB), as colônias de *E. coli* apresentam coloração negro-esverdeadas com brilho metálico (ORSKOV & ORSKOV 1992, MURRAY et al. 1999, KONEMAN et al. 2006).

A *E. coli* é encontrada normalmente na microbiota entérica (intestino) de aves e mamíferos. Nos seres humanos, normalmente colonizam o trato gastrintestinal dentro de algumas horas após o nascimento, quando bactérias presentes na mucosa vaginal e na pele da mãe, além provenientes de fontes ambientais, são adquiridas pelo recém-nascido. (KAPER et al. 2004, TENAILLON et al. 2010). É uma bactéria comensal no trato intestinal (sem potencial patogênico) e permanece sem causar dano. Em casos especiais como no déficit imunológico ou dano das barreiras gastrintestinais, as cepas comensais podem tornar-se infecciosas (WILES et al. 2008, TENAILLON et al. 2010). Embora 90% das cepas de *E. coli* sejam comensais e não patogênicas, aproximadamente 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e infecções extra-intestinais (KAPER et al. 2004, SANTOS et al. 2009).

1.2.1 Classificação de *E. coli*

A *E. coli* é um dos agentes mais importantes nas infecções extra-intestinais em humanos (KARISIK et al. 2008) e a segunda espécie mais prevalente em bacteremias (BIEDENBACH 2004). As estirpes de *E. coli* de importância biológica para os seres humanos podem ser classificadas em: i) cepas comensais, ii) cepas patogênicas intestinais ou diarreiogênicas e iii) cepas patogênicas extra-intestinais denominadas de ExPEC - *extraintestinal pathogenic E. coli* (RUSSO & JOHNSON 2000, PITOUT 2012).

As cepas de *E. coli* patogênicas intestinais, são denominadas de DEC “*Diarrheagenic Escherichia coli*” – *E. coli* diarreio gênica –, e podem ser classificadas nos patótipos: ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), DAEC (*E. coli* que adere difusamente), EPEC (*E. coli* enteropatogênica), A-EPEC (*E. coli* enteropatogênica atípica) e EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) (RUSSO & JOHNSON 2000, KAPER et al. 2004, SANTOS et al. 2009, CROXEN & FINLAY 2010).

A designação ExPEC (*E. coli* patogênica extra-intestinal) abrange os seguintes patótipos: UPEC (*E. coli* uropatogênica), SePEC (*E. coli* associada à septicemia), MNEC (*E. coli* associada à meningite neonatal) e APEC (*E. coli* patogênica para aves) (KAPER et al. 2004, KOHLER & DOBRINDT 2011, JAHANDEH et al. 2015). As ExPECs têm capacidade de colonizar o trato gastrointestinal e formar parte da microbiota intestinal sem causar doença na população saudável (WILES et al. 2008). A **figura 1.1** demonstra os sítios de colonização da *Escherichia coli* patogênica nos seres humanos.

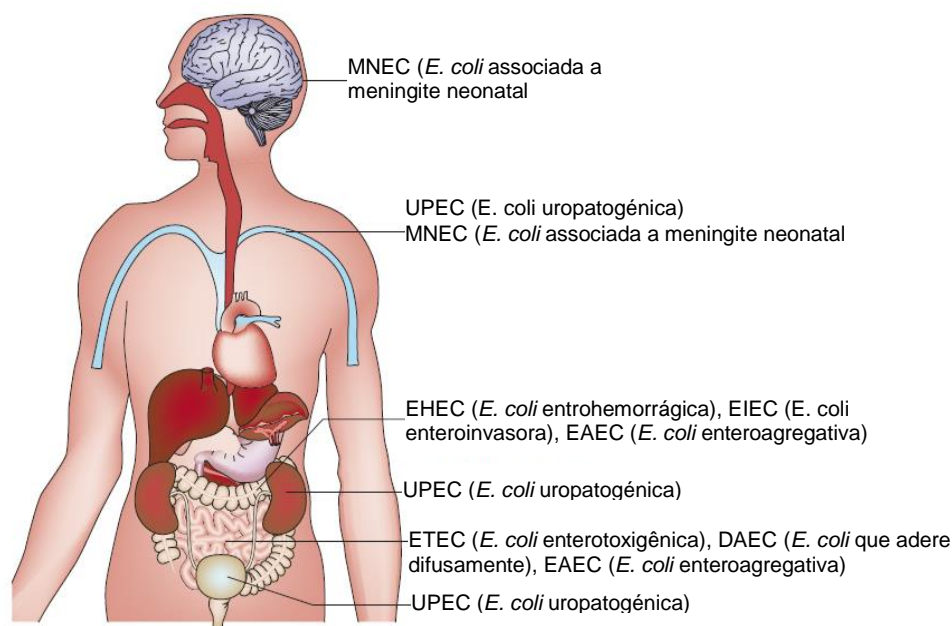


Figura 1.1 Locais de colonização de *E. coli* patogênica

Fonte, Adaptado de CROXEN & FINLAY 2010

1.2.2 Filogenia em populações bacterianas de *E. coli*.

Os estudos filogenéticos mostram que as populações bacterianas de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos principais, designados

como, A, B1, B2 e D (HERZER et al. 1990, CLERMONT et al. 2000), e seis subgrupos A₀ e A₁ (grupo filogenético A), D₁ e D₂ (grupo filogenético D) e B2₂ e B2₃ (grupo filogenético B2) (ADIB et al. 2014). As ExPECs pertencem em sua maioria ao grupo filogenético B2 e, em menor escala, ao grupo D, os quais possuem maiores fatores de virulência que os grupos filogenéticos A e B1 (YAMAMOTO 2007, KARISIK et al. 2008). As cepas comensais (sem potencial patogênico) pertencem aos grupos filogenéticos A e B1, enquanto que as amostras patogênicas intestinais agrupam-se igualmente nos grupos filogenéticos A, B1 e D (CLERMONT et al. 2000, KARISIK et al. 2008, SANTOS et al. 2009, KOHLER & DOBRINDT 2011). Na **Figura 1.2** observa-se a relação entre os patótipos e os grupos filogenéticos de *E. coli*.

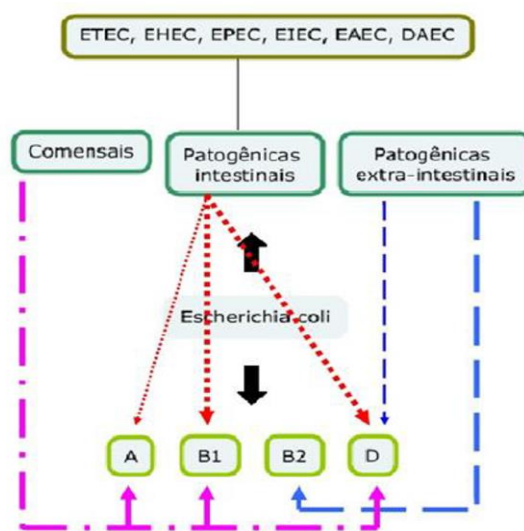


Figura 1.2. Patótipos de *E. coli* e grupos filogenéticos

Fonte: FERREIRA 2010.

Para esta classificação filogenética de *E. coli*, Clermont et al (2000) desenvolveram um protocolo baseado na amplificação simultânea de sequências genéticas específicas, utilizando dois genes - *chuA* (*outer membrane hemin receptor*), *yjaA* (*uncharacterized protein yjaA genome of E. coli K-12*) - e um fragmento de DNA denominado *TspE4.C2* (*anonymus DNA fragmente*) como marcadores específicos desses grupos filogenéticos.

O gene *chuA* está presente nos grupos B2 ou D e ausente nos grupos A e B1, permitindo a distinção entre estes pares de grupos filogenéticos. O gene *yjaA* possibilita a distinção entre os grupos B2 e D sendo detectado apenas no grupo B2. A presença do fragmento *TspE4.C2* caracteriza a amostra como pertencendo ao grupo B1, enquanto a sua ausência está associada ao grupo filogenético A. A **figura**

1.3 apresenta o esquema da classificação filogenética por amplificação de sequências específicas.

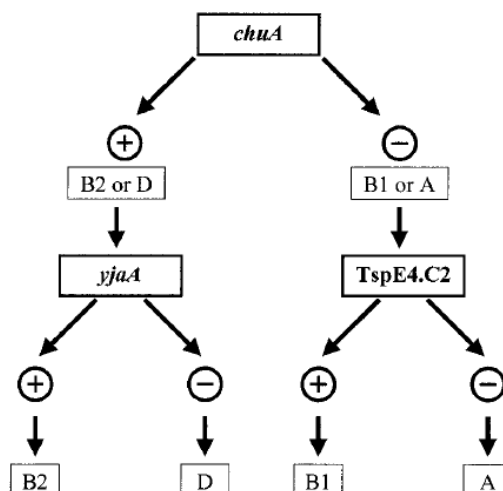


Figura 1.3. Árvore da classificação dos grupos filogenéticos de *E. coli* na presença e ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento *TspE4.C2*

Fonte: CLERMONT et al. 2000

As amostras que se classificam nos grupos filogenéticos B2 ou D são frequentemente responsáveis por infecções agudas do trato urinário (KARISIK et al. 2008).

1.2.3 Fatores de virulência de *E. coli* uropatogênica.

Os fatores de virulência nas UPEC podem ser divididos em dois grupos: (i) fatores de virulência associados com a superfície da célula bacteriana e, (ii) fatores de virulência que são secretados no sítio de ação (BIEN et al. 2012).

No grupo dos fatores de virulência associados à superfície da célula bacteriana, temos as estruturas que promovem a união da bactéria aos tecidos no trato urinário. Neste grupo estão as fímbrias e adesinas. As fímbrias tipo 1, associadas às ITU baixas, a fímbria P, associada às ITU altas (pielonefrite), a fímbria S, as adesinas da família Dr, como as adesinas fimbriais e as afimbriais (AFA I-II-III-IV) e o flagelo, que é responsável pela motilidade da bactéria. As fímbrias e adesinas possuem uma função importante na patogênese da ITU, contribuindo à união das bactérias às células uroepiteliais na iniciação da infecção urinária. Neste grupo também se incluem os antígenos capsulares tipo K1, K5, K12 e os lipopolissacarídeos (LPS) (YAMAMOTO 2007, OLIVEIRA et al. 2011, BIEN et al.

2012, PITOUT 2012). *E. coli* uropatogênica tem sido encontrada formando biofilme bacteriano, que confere importantes vantagens, como resistência à desidratação e à oxidação, e maior tolerância aos detergentes e antibióticos (JUSTICE et al. 2004).

No grupo dos fatores de virulência que são secretados no sítio de ação, cita-se as toxinas, que são úteis na colonização do tecido uroepitelial, causando resposta inflamatória e aparecimento de sintomas. Entre as toxinas temos a alfa-hemolisina, o fator necrotizante citotóxico tipo I, a toxina secretora auto-transportadora (SAT), o antígeno O, os sistemas de consumo de ferro como a aerobactina e yersiniabactin e, fatores que aumentam resistência no soro (YAMAMOTO, 2007; WILES *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al* 2011; BIEN et al. 2012, PITOUT 2012).

1.3 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana pode ser definida como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estão sendo expostas (LIVERMORE 1995). Quando as células bacterianas são expostas a antimicrobianos inadequados ou em doses inadequadas, as cepas suscetíveis são destruídas e sobrevivem as resistentes, processo que se denomina pressão seletiva (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ 2006). Para que cada bactéria se defenda, ela pode utilizar mecanismos naturais de defesa, sofrer mutações que originam sua resistência ou adquirir genes de resistência de outras células (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ 2006, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ & CALVO 2010).

A resistência a antimicrobianos mediada pelas bactérias ocorre devido às características codificadas geneticamente, podendo ser intrínseca (natural) ou adquirida. A resistência intrínseca é resultante da genética, estrutura e fisiologia natural no microrganismo e ocorre em grupos específicos (**Quadro 1.3**). Esta resistência intrínseca é útil na escolha dos antimicrobianos a serem incluídos no teste de sensibilidade para determinados microrganismos (PÉREZ-CANO & ROBLES-CONTRERAS 2013). A resistência adquirida resulta da alteração de estrutura e fisiologia celular, causada por mudanças na genética normal do microrganismo, adquirida por mutação genética, aquisição de genes de outros microrganismos, ou uma associação de ambos. Ao contrário da resistência intrínseca, ocorre em apenas algumas cepas de um grupo ou espécie (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ 2006, PÉREZ-CANO & ROBLES-CONTRERAS 2013).

Quadro 1.3 Exemplos de resistência natural das bactérias aos antibióticos

Microrganismo	Antimicrobiano	Mecanismos
Bactérias Gram-negativas	Glicopeptídeos	Baixa acumulação intracelular
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Carbapenêmicos	Presença de enzimas metalo- β -lactamases
Bactérias Gram-positivas	Polimixinas	Ausência de lipopolissacarídeo
<i>Enterococcus</i> spp.	Cefalosporinas	Pouca afinidade das PBP
Anaeróbios	Aminoglicosídeos	Ausência de transporte

PBP, proteína de ligação a penicilina

Fonte, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ 2006

1.3.1 Mecanismos de resistência.

Ao longo do tempo, cada vez mais classes de antibióticos foram utilizadas de forma indiscriminada na terapêutica ou profilaxia, passando ainda pelo uso no crescimento animal e propósitos agrícolas (ECONOMOU & GOUSIA 2015). Isto faz com que os animais e vegetais para o consumo humano sejam atualmente uma fonte de difusão de material genético entre bactérias patogênicas e comensais (FURUYA & LOWY 2006). Porém, as bactérias desenvolveram variados mecanismos que conferem resistência aos antibióticos, de modo a conseguirem sobreviver na presença destes compostos. Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antibióticos: i) alteração da permeabilidade da membrana, ii) modificação ou proteção do alvo, iii) expulsão ativa do antibiótico e iv) modificação ou inibição enzimática do antibiótico (MARTÍNEZ-MARTINEZ 2006, PELEG & HOOPER 2010, PÉREZ-CANO & ROBLES-CONTRERAS, 2013).

1.3.2 Disseminação dos genes de resistência .

A aquisição de genes de resistência por parte de um microrganismo pode ser feita por i) conjugação, ii) transformação, iii) transdução e iv) transposição (**Figura 1.4**). A conjugação é o mecanismo mais comum de transferência de material genético, onde o contato com outras bactérias possibilita a transferência de genes presentes em uma molécula de DNA extra-cromossômica denominada plasmídeo (MARTÍNEZ-MARTINEZ 2006, DAVIES & DAVIES 2010).

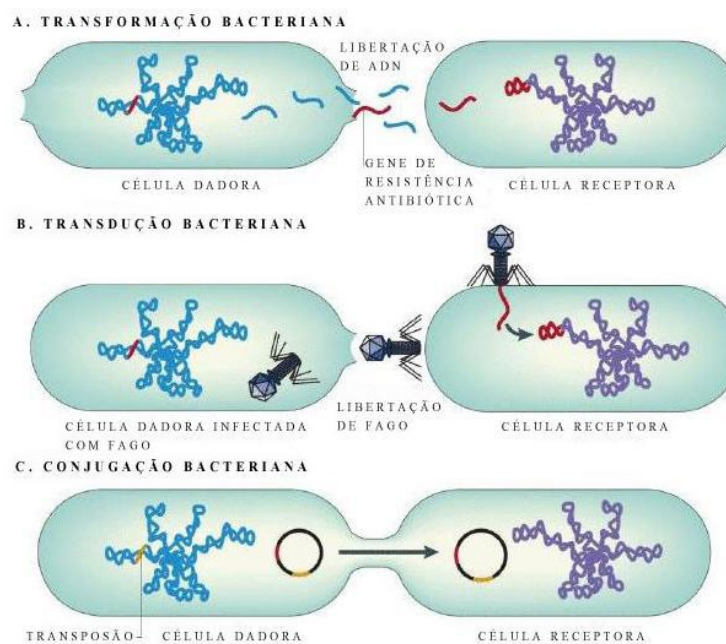


Figura 1.4 Representação ilustrada da transferência horizontal de genes.

Fonte, Adaptado de FURUYA & LOWY 2006

Atualmente, é cada vez mais frequente a emergência de estirpes multirresistentes aos antibióticos, principalmente devido à rápida disseminação de genes de resistência. Esta transferência horizontal de genes ocorre através de elementos móveis (transposões ou integrões) e/ou plasmídeos, contribuindo para a evolução e adaptação bacteriana ao meio ambiente (MULVEY & SIMOR 2009, FRIERI et al. 2016).

1.3.3 Integrons

Os integrons são elementos genéticos que têm capacidade de reconhecer, capturar eficientemente e expressar genes cassettes exógenos, principalmente genes de resistência, por um sistema de recombinação sitio-específico (COLLIS & HALL 1995, ESCUDERO et al. 2015). São amplamente conhecidos por seu papel na disseminação da resistência, particularmente entre patógenos bacterianos Gram-negativos. No entanto, desde a sua descoberta, tornou-se evidente que os integrons são um componente comum de genomas bacterianos e que tem uma longa história evolutiva (GILLINGS 2014).

Estruturalmente os integrons consistem em dois segmentos conservados 5' e 3', e uma região central ou variável, constituída por uma diversidade de genes cassette (que geralmente são curtos, achados até oito cassettes genéticas), que

normalmente conferem resistência às diferentes classes de antibióticos (COLLIS & HALL 1995, BENNETT 2008, GILLINGS 2014). São constituídos por um gene *intI* que codifica a enzima integrase, um local de recombinação (*attI*), onde pode ocorrer inserção ou excisão de cassetes genéticos, e um promotor (**Figura 1.5**) (GILLINGS 2014, BARRAUD & PLOY, 2015).

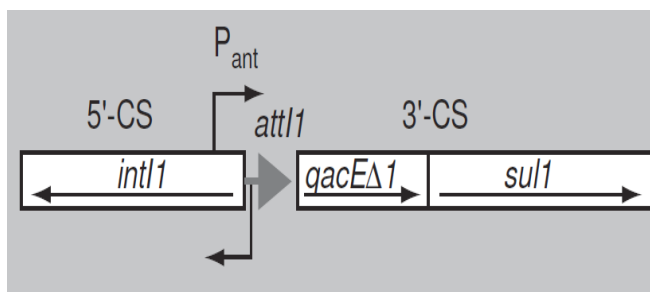


Figura 1.5 Estrutura do integron. **Fonte,** SABATÉ & PRATS 2002.

Os integrons de maior interesse clínico e epidemiológico são de classe 1, que são os mais comuns entre os isolados clínicos de bactérias Gram-negativas. Estes contêm genes cassette de resistência antibiótica integrados na região variável principalmente para antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, quinolonas, estreptomicina e fosfomicina (SABATÉ & PRATS 2002, PARTRIDGE 2002, ESCUDERO et al. 2015). Na atualidade, mais de 130 genes cassette já foram identificados em integrons de classe 1 (GILLINGS 2014, ESCUDERO et al. 2015), sendo os mais conhecidos e caracterizados aqueles associados às bactérias Gram-negativas multirresistentes, nomeadamente *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp. e *Salmonella* spp. (PENG et al. 2007).

1.4 Resistência aos antibióticos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são os antimicrobianos mais administrados tanto na atenção primária como nos hospitais, dada a sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade (MARÍN & GUDIOL 2003). Atuam inibindo a última etapa da biossíntese da parede celular bacteriana, interferindo com a síntese do peptidoglicano. Todos os compostos, naturais ou sintéticos, deste grupo (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams) são caracterizados por possuírem um anel beta-lactâmico com uma cadeia lateral variada, que explica as características, espectros

de ação e resistências às beta-lactamases de cada antibiótico. (SUÁREZ & GUDIOL 2009, GUIMARÃES et al. 2010).

A resistência bacteriana aos β -lactâmicos é principalmente por: **i)** modificação da permeabilidade da membrana externa nos Gram-negativos, principalmente por alteração das porinas, **ii)** modificação dos alvos, mudanças nas PBPs, **iii)** produção de enzimas que vão hidrolisar e inativar o núcleo β -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas e carbapenems (**β -Lactamases**), o qual constitui o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, **iv)** expressão de bombas de efluxo (MARÍN & GUDIOL 2003, WILKE et al. 2005, FERNANDES et al. 2013).

1.4.1 Enzimas β -lactamases

A produção de β -lactamases é o mais importante mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (WILKE et al. 2005, DALMARCO et al. 2006). Uma vez expressas, as β -lactamases são secretadas no espaço periplásmico (em bactérias Gram-negativas), hidrolisam e inativam irreversivelmente o anel β -lactâmico na ligação amida, impossibilitando a atividade antibacteriana do antibiótico (WILKE et al. 2005, MARTINEZ-MARTINEZ 2006). Determinados tipos de β -lactamases podem ser produzidos por diferentes espécies bacterianas, mas uma única espécie também pode produzir diferentes tipos de β -lactamases (JUNIOR et al. 2004). A especificidade destas enzimas aos anéis β -lactâmicos determina a eficácia da hidrólise dos mesmos. A capacidade ou não das β -lactamases de conferir resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro depende da quantidade de enzima produzida pelo microrganismo, da habilidade dessa enzima de hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o β -lactâmico penetra na membrana externa (LIVERMORE 1991).

1.4.2 Classificação das β -lactamases

Em 1995 foi publicado pelo grupo de Bush, Jacoby e Medeiros uma classificação das β -Lactamases, baseando-se na preferência pelos substratos β -lactâmicos e pela inibição do clavulanato (BUSH et al. 1995). No ano 2010, a classificação é atualizada, levando em conta o substrato e o mecanismo de inibição da β -lactamase para correlacionar com seu fenótipo (BUSH & JACOBY 2010). Entretanto, em 1980, Ambler propôs outra classificação, que divide as β -lactamases em 4 classes, baseadas em sua sequência de aminoácidos. São classificadas como

classe A aquelas que possuem como sítio ativo a serina; a classe B são metalo-beta lactamases, que requerem um metal bivalente, usualmente zinco, para sua atividade (presentes em *Stenotrophomonas maltophilia*); a classe C, também chamado AMP-C; e a D que são as OXA-metalo- β -lactamases (AMBLER 1980). Na atualidade, têm sido consideradas as duas classificações, propostas por Ambler e por Bush, Jacoby & Medeiros (**Quadro 1.4**).

Quadro 1.4. Classificação das β -lactamases

Bush-Jacoby group	Ambler Classe molecular	Características	Enzimas selecionadas
1	C	Hidrolisa cefalosporinas, cefamicinas penicilinas. Não são inibidas por CLA e TZB. Afinidade elevada para aztreonam	<i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AmpC. CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Hidrolisa penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas amplo espectro e monobactâmicos. Não inibida pelo CLA e TZB	GC1, CMY-37
2 ^a	A	Eficiente hidrólise de penicilinas. Inibida pelo CLA e TZB	PC1 e outros estafilococos penicilinases
2b	A	Hidrolisa penicilinas, cefalosporinas de primeira geração (cefazolina, cefalotina, cefaloridina). Inibida pelo CLA e TZB	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TLE-1 (TEM-90)
2be	A	Hidrólise eficiente de penicilinas, cefalosporinas amplo espectro, monobactâmicos. Inibida pelo CLA e TZB	ESBLs: CTX-M-15, CTX-M-44 (Toho-1), PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1
2br	A	Hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas de primeira geração. Inibição deficiente pelo CLA	IRTs: TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
2ber	A	Hidrólise eficiente de penicilinas, cefalosporinas amplo espectro, monobactâmicos. Inibição deficiente pelo CLA e TZB	CMTs: TEM-50, TEM-68, TEM-89
2c	A	Hidrólise eficiente de carbenicilina. Inibida pelo CLA	PSE-1, CARB-3
2d	D	Hidrólise eficiente de cloxacilina ou oxacilina. Levemente inibida por CLA	OXA-1, OXA-10
2de	D	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro. Levemente inibida por CLA	ESBLs: OXA-11, OXA-15
2df	D	Hidrólise de carbapenêmicos e cloxacilina ou oxacilina. Levemente inibida por CLA	OXA-23, OXA-48
2e	A	Hidrólise eficiente de cefalosporinas. Inibida pelo CLA e TZB, mas não pelo aztreonam.	CepA
2f	A	Hidrólise de carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas e cefamicinas. Pobre inibição pelo CLA; baixa inibição por TZB	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2
3 ^a	B	Hidrólise de todos os b-lactâmicos exceto monobactâmicos. Inibida por EDTA e agentes quelantes de íons metálicos, não inibida pelo CLA e TZB.	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1
3b	B	hidrolise para carbapenêmicos. Inibida por EDTA e agentes quelantes de íons metálicos, não inibida pelo CLA e TZB.	CphA, Sfh-1

CLA, ácido clavulânico; CMT, complexo mutante TEM; ESBL, β -lactamase de amplo espectro; IRT, resistência ao inibidor TEM; TZB, tazobactam.

Fonte, Modificado de BUSH & FISHER, 2011

1.4.2.1 β -Lactamases de Espectro Estendido, tipo AmpC

AmpC a foi a primeira β -lactamase descrita na resistência à penicilina (JACOBY 2009), pertence às β -lactamases da classe molecular C de Ambler (grupo 1 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros). São cefalosporinas codificadas de forma natural por cromossomos de bactérias da família Enterobacteriaceae. Mais recentemente são descritas como possivelmente transmitidas por elementos móveis (transposões ou integrões) e/ou plasmídeos (PEIRANO et al. 2006, SERAL et al. 2012). Hidrolisam cefalosporinas de primeira e segunda gerações, incluindo as cefamicinas, tem menor ação sobre cefalosporinas de terceira geração e são pouco eficazes sobre cefalosporinas de quarta geração e carbapenêmicos. A cloxacilina, aztreonam e o ácido borônico (ácido fenil borônico) inibem as β -lactamases tipo AmpC, enquanto os inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) não inibem ESBL-AmpC (JACOBY 2009, BUSH & JACOBY 2010, NAVARRO et al. 2011). As ESBL-AmpC têm sido encontradas tanto em infecções nosocomiais, quanto em infecção na comunidade (SERAL et al. 2012).

Diferenças nas sequências de aminoácidos deu origem às famílias de AmpC, entre os quais temos atualmente: CMY, 136 variantes; ACC, 5 variantes; ACT, 38 variantes; CFE, 1 variante; DHA, 23 variantes; FOX, 12 variantes; LAT-1, 1 variante; MIR, 18 variantes; e MOX, 11 variantes. (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>) (PÉREZ & HANSON 2002, JACOBY 2009). A variante CMY-2, atualmente, é a mais distribuída no mundo (JURE et al. 2011).

1.4.2.2 β -Lactamases de Espectro Estendido, tipo SHV

Foram as primeiras ESBLs descritas, em 1983 na Alemanha, em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, do precursor comum SHV-1 (KNOTHE et al. 1983). A maioria das β -Lactamases SHV tem fenótipo ESBL, com exceção da SHV-4, SHV-10 e SHV-11, e são caracterizadas pela substituição de uma serina por uma glicina, na posição 238 (PATERSON & BONOMO 2005). Por outro lado, as variantes relacionadas às ESBLs SHV-5 apresentam uma substituição da lisina por glutamato, na posição 240. O resíduo de serina é fundamental para a hidrólise eficaz da ceftazidima e o resíduo de lisina para a hidrólise eficaz da cefotaxima (BRADFORD 2001). É importante salientar que SVH-38 tem fraca atividade carbapenemase e

produz moderados aumentos na concentração inibitória mínima (CIM) de imipenem; SHV-2 em cepas de *K. pneumoniae* deficientes de porinas pode causar uma diminuição na sensibilidade ao imipenem (MARTÍNEZ & CALVO 2010). Na atualidade temos 193 variantes de β -Lactamases tipo SHV (<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#SHV>).

1.4.2.3 β -Lactamases de Espectro Estendido, tipo TEM

Foi descrita no ano 1986, na França, em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, derivadas do precursor TEM-1 e TEM-2 (BRUN-BUISSON et al. 1987). A substituição de um único aminoácido na β -lactamase TEM-1 deu origem a um novo tipo, TEM-2. A modalidade TEM-3, originalmente descoberto em 1989, foi a primeira β -lactamase que apresentou o fenótipo ESBL (BRADFORD 2001). Após isso, muitos outros derivados de TEM foram relatados, sendo alguns resistentes aos inibidores de β -lactamases e a grande maioria com fenótipos ESBL (LIVERMORE 1995, BRADFORD 2001).

Atualmente existem 223 variantes das β -Lactamases de tipo TEM (<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>). As substituições de aminoácidos ocorrem entre as enzimas TEM em número limitado de posições e as combinações destas mudanças de aminoácidos resultam em várias alterações na hidrólise de oximino-cefalosporinas específicas, como cefotaxima e ceftazidima (BRADFORD 2001). O fato de TEM-1 e outros derivados serem mediados por plasmídeos e transposons facilita a disseminação para outras espécies de bactérias (CARATTOLI 2009, WOODFORD et al 2009).

As β -Lactamases TEM são prevalentes nas estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas também são encontradas em outras espécies de bactérias Gram-negativas como *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp. (BRADFORD, 2001).

1.4.2.4 β -Lactamases de Espectro Estendido, tipo CTX-M

A β -Lactamase de espectro estendido, CTX-M (hidrolisa CefoTaXime), foi descrita pela primeira vez no Japão, no ano 1986, no isolamento de *E. coli* resistente à cefotaxima, e foi chamada de TOHO-1. Em 1989 na Alemanha, foi descrita outra cepa de *E. coli* resistente à cefotaxime e foi chamada de CTX-M-1 (BONNET 2004). Ao mesmo tempo, em 1992, na Argentina, foram também descritos isolados de

Salmonella typhimurium resistentes à cefotaxima, enzimas chamadas de CTX-M-2 (BAUERNFEIND et al. 1992, BONNET 2004). No Brasil, as primeiras CTX-M foram descritas na cidade do Rio de Janeiro, nos anos 90, principalmente, as enzimas CTX-M-2, CTX-M-8; CTX-M-9; CTX-M-14 e CTX-M-16 (BONNET, 2004).

Na família de ESBLs plasmídicas, CTX-M, é mais frequente entre isolados de *Salmonella enterica* e *E. coli*, sendo observada também em outras espécies de Enterobacteriaceae. Esta enzima tem como substrato preferencial a cefotaxima e a ceftriaxona. As CTX-M- β -lactamases apresentam 40% de similaridade com as β -lactamases TEM e SHV. Provavelmente foram originadas a partir da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata*, uma vez que possuem alto grau de homologia (BRADFORD 2001, BONNET 2004). Outra característica desta enzima é o fato de ser mais inibida pelo tazobactam do que sulbactam e/o ácido clavulânico (BONNET 2004). As CTX-M- β -lactamases são codificadas por genes transportados por elementos móveis, como sequências de inserção *ISCcp1 - ISCR1* e plasmídeos (CARATTOLI 2009, WOODFORD et al. 2009, PEIRANO & PITOUT 2010).

Estudos filogenéticos da família CTX-M, baseados na similitude de aminoácidos, reportam 5 sublinhagens ou grupos principais: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25, e ultimamente, dois grupos foram reportados: CTX-M-74 e CTX-M-75 (SENNATI et al. 2012, D'ANDREA et al. 2013, LAHLAOUI et al. 2014). Atualmente existem mais de 172 variantes de CTX-M (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>) que têm sido associadas a surtos de infecções diversas, tanto nos hospitais como na comunidade, sendo isoladas em vários tipos de bactérias, e mais frequentemente em *E. coli* (MATHERS et al. 2015, PITOUT & LAUPLAND 2008).

Na atualidade, diferentes famílias dominantes de CTX-M têm sido encontradas: CTX-M-15 (grupo 1), é predominante na maior parte da Europa, América do Norte, Oriente Médio e Índia; CTX-M-14 (grupo 9) é mais comum na China, Sudoeste da Ásia, e na Espanha; e CTX-M-2 (grupo 2) é predominante na Argentina, Israel e Japão (HAWKEY & JONES 2009, LIVERMORE 2012), como sumarizado na **Figura 1.6**.

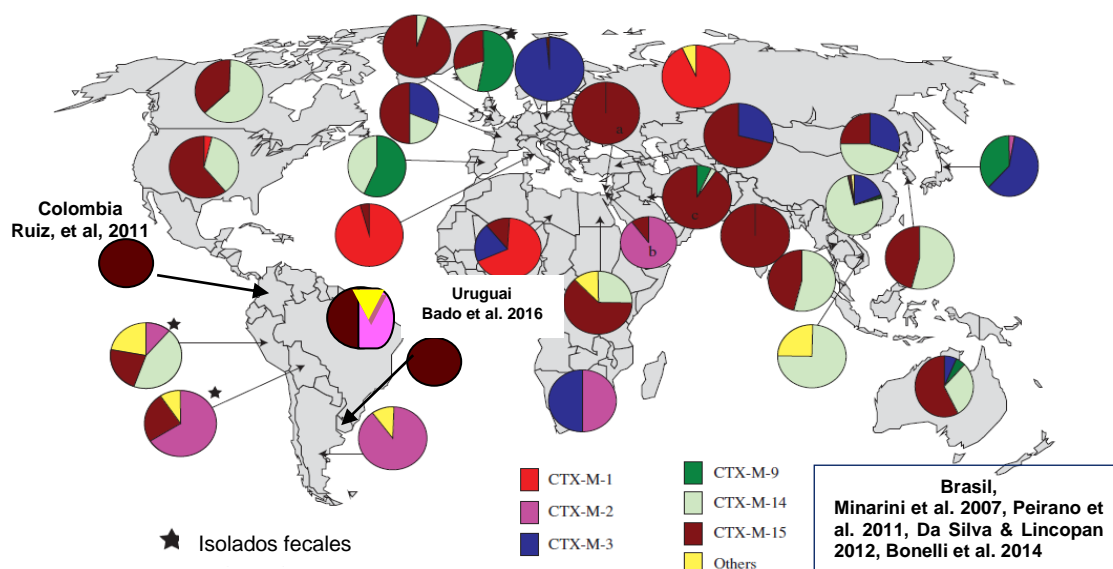


Figura 1.6 Distribuição mundial dos genótipos CTX-M.

Fonte, Adaptado de HAWKEY & JONES 2009.

Observa-se que o **clone ST131**, identificado por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) relacionado à bactéria *E. coli* extraintestinal (ExPEC) produtora de ESBLs e associado ao grupo filogenético B2, foi descrito no ano 2008 e têm relação com a produção da enzima CTX-M-15 (WOODFORD et al. 2009, SCHEMBRI et al. 2015, MATHERS et al. 2015). Este clone O25b:H4/ST131-CTX-M-15 é altamente virulento, e está associado às infecções sanguíneas e trato urinário no ambiente hospitalar e comunitária (PETTY et al. 2014, SCHEMBRI et al. 2015) e apresenta resistência cruzada para antibióticos dos grupos das fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e trimetoprim/sulfametoxasole (PEIRANO & PITOUT 2010, SCHEMBRI et al. 2015, MATHERS et al. 2015, STOESSER et al. 2016).

Atualmente, o clone ST131-*Escherichia coli* se espalhou por todo o mundo (**Figura 1.7**) relacionados à infecções nosocomiais e infecção na comunidade (PETTY et al. 2014, STOESSER et al. 2016). Esta bactéria foi descrita em animais, alimentos, carne bovina entre outros, o que sugere uma disseminação geral deste clone (PLATELL et al. 2011, ROGERS et al. 2011, NOVAIS et al. 2012). Esta disseminação faz com que este clone seja considerado uma emergência em saúde pública, principalmente por apresentar multirresistência, presença de vários fatores de virulência (FimH30) e pela facilidade de transmissão genética envolvidos em elementos genéticos móveis (PETTY et al. 2014, MATHERS et al. 2015, STOESSER et al. 2016). Isto tem enorme significado clínico pela limitação na escolha de

antibióticos para o tratamento nos casos de infecções graves causadas por este clone (PETTY et al. 2014).



Figura 1.7. Distribuição mundial do clone *E. coli* ST-131-CTX-M-15.

Fonte, Adaptado de NICOLAS-CHANOINE 2014

Estrela vermelha, amostras que produzem enzimas ESBL. Estrela azul, amostras resistentes às fluoroquinolonas não-produtoras de ESBL

1.5 Resistência às fluoroquinolonas.

As quinolonas e fluoroquinolonas são fármacos bactericidas muito utilizados no tratamento de ITUs e também no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes a outros agentes antibacterianos (GUIMARÃES et al. 2010). Elas inibem a atividade da DNA girase ou topoisomerase IV, impedindo o processo de transcrição e replicação do DNA bacteriano. Em bactérias Gram-positivas, sua ação dá-se principalmente pela inibição da topoisomerase IV, enquanto em Gram-negativas, sobrepõe-se a ação sobre a DNA-girase (NAEEM et al. 2016).

Os mecanismos de resistência às quinolonas são, principalmente: **i)** alteração do alvo, **ii)** redução da concentração intracelular do antibiótico, mediada por sistemas de efluxo, **iii)** proteção do alvo das quinolonas, mediada por peptídeos e, **iv)** degradação enzimática (RODRIGUEZ-MARTINEZ 2005, ROBICSEK et al. 2006,

RUIZ, 2012). Estes mecanismos são mediados por genes cromossômicos e por genes de localização plasmidial.

1.5.1 Mecanismos de resistência de origem cromossômico

A resistência às fluoroquinolonas deve-se às mutações em regiões específicas dos genes estruturais DNA girase e topoisomerase IV, que fazem com que o antibiótico não se ligue ao alvo. Esta é a mutação mais comum encontrada na presença destes antibióticos. Nas bactérias Gram-negativas a DNA girase é o principal alvo de todas as quinolonas e nas bactérias Gram-positivas tanto pode ser a DNA girase como a topoisomerase IV, dependendo da fluoroquinolona utilizada (RODRIGUEZ-MARTINEZ 2005, RUIZ 2012).

1.5.2 Mecanismos de resistência plasmideais.

Três mecanismos de resistência às quinolonas mediadas por plasmídeos (PMQR) são conhecidos atualmente: i) proteção da DNA girase e a topoisomerase IV, mediadas pelos genes *qnr*, ii) acetilação mediada pelo gene *aac(6`)-Ib-cr*, alelo da enzima modificadora de aminoglicosídeos (EMAs) *aac(6`)-Ib* e iii) bombas de fluxo, mediadas pelos genes *qepAB* e *oqxAB* (STRAHILEVITZ et al. 2009, ANDRES et al. 2013, JACOBY et al. 2014).

1.5.2.1 Gene *qnr*, proteção do alvo.

Até o ano de 1998, considerava-se que a resistência às quinolonas não era transferível. Neste ano, o primeiro determinante de resistência às quinolonas foi descrito, o gene *qnr*, em amostras de *Klebsiella pneumoniae* de origem urinária, na Universidade de Alabama – USA (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al. 1998). O gene *qnr* é um pentapeptídeo que codifica a proteína que protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição por quinolonas. Ele se fixa à estas enzimas em competição com o DNA bacteriano, resultando em altos níveis de resistência à este grupo de medicamentos (STRAHILEVITZ et al. 2009, JACOBY et al. 2014).

Atualmente são reconhecidas cinco variantes dos genes *qnr*, denominadas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, e *qnrS*, e cada uma delas apresenta vários alelos (ANDRES et al. 2013; JACOBY et al. 2014). O gene *qnr* tem sido achado em várias Enterobactérias, especialmente *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Salmonella enterica*, e em

bactérias não-fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia*. A sua facilidade de mobilização está ligada a elementos móveis, principalmente plasmídeos. Assim, o *qnrA* é carregado na *ISCR1*, *qnrB1* na *IS26*, *qnrB2-4-6-10* na *ISCR1*, e, o *qnrB19* é carregado por três elementos: i) plasmídeo associado a *ISEcp1C-based* transposon, ii) *IS26*, e iii) plasmídeo pequeno *ColE1-type* (JACOBY et al. 2014)

1.5.2.2 Gene *aac(6')-Ib-cr*, inativação do antibiótico.

No ano de 2005, foi reportado um novo mecanismo de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos, o gene *aac(6')-Ib-cr*, o qual é responsável pela inativação enzimática principalmente de ciprofloxacina e norfloxacina (ROBICSEK et al. 2006). O gene *aac(6')-Ib-cr* é uma variante do gene *aac(6')-Ib* pertencente às enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos (EMAs). Esta variante *cr* (do inglês, *ciprofloxacin resistance*) codifica uma acetiltransferase que inativa os aminoglicosídeos como amicacina, kanamicina e tobramicina, e antibióticos do grupo das fluoroquinolonas como ciprofloxacina e norfloxacina por N-acetilação do radical amino piperazinil. O determinante *aac(6')-Ib-cr* tem dois aminoácidos diferentes de sua sequência original, Trp102Arg e Asp179Tyr, os quais demonstram serem necessários e suficientes para promover a acetilação da ciprofloxacina e da norfloxacina (ROBICSEK et al, 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2011, RUIZ et al. 2012, JACOBY et al, 2014).

O determinante *aac(6')-Ib-cr* tem sido encontrado nos genes cassette do integron, formando parte de plasmídeos que contêm outros genes PMQR, geralmente o gene *qnr*, associados com ESBL principalmente CTX-M-15, que em conjunto formam parte do elemento genético móvel *IS26* (JACOBY et al. 2014).

1.6 Resistência aos aminoglicosídeos.

Os aminoglicosídeos são antibióticos com ação bactericida rápida, usados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas aeróbias. Atuam ligando-se à fração 30S dos ribossomos inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas defeituosas (VAKULENKO & MOBASHERY 2003, MOLINA et al. 2009).

Algumas espécies de bactérias como as anaeróbias e *Enterococcus* têm resistência intrínseca ou natural aos aminoglicosídeos, por alteração no transporte através da parede bacteriana, transporte que é dependente de oxigênio (MELLA et al. 2004, MOLINA et al. 2009). Outros mecanismos de resistência são: i) Inativação ou modificação enzimática, ii) diminuição da permeabilidade aos amiglicosídeos através da parede celular, iii) mutação ou modificação do alvo e iv) sistema de expressão de bombas de fluxo (VAKULENKO & MOBASHERY 2003, MELLA et al. 2004, MOLINA et al. 2009, WACHINO & ARAKAWA 2012)

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos em bactérias Gram-negativas é a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (MOLINA et al. 2009, RAMIREZ & TOLMASKY 2010), mas, na atualidade, tem sido descrito outro importante mecanismo de resistência mediada por plasmídeos, os genes 16S rRNA metilases. Estes genes protegem o ribossomo através da metilação dos nucleotídeos específicos dentro da subunidade 16S rRNA, o que faz que os antibióticos tenham dificuldade de se ligar ao seu alvo 30S ribossomal (DOI & ARAKAWA 2007, YANG et al. 2011)

1.6.1 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs).

As EMAs catalisam a modificação dos grupos -OH ou -NH₂ dos aminoglicosídeos e apresentam três tipos: as nucleotiltransferases (ANTs), fosfotransferases (APHs) e acetiltransferases (AACs). Os genes que codificam estas enzimas podem estar localizados em plasmídeos, transposons e integrons, junto com outros determinantes de resistência como β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases resultando em isolados multirresistentes (SHAW et al. 1993, WOODFORD et al. 2009, RAMIREZ & TOLMASKY 2010).

1.6.2 Acetiltransferases (AACs)

As acetiltransferases modificam os aminoglicosídeos com a transferência de um grupo acetil da acetil-coenzima A (AcCoA) para um grupo amino, produzindo acetilaminoglicosídeo e coenzima A (CoASH) como produto. Essas enzimas catalisam a acetilação das posições 1 [AAC(1)], 3 [AAC(3)-I], 2' [AAC(2')] ou 6' [AAC(6')], resultando em quatro classes (RAMIREZ e TOLMASKY 2010).

As AAC(3'), constituem o segundo grupo mais comum de acetiltransferases. Possuem nove subclasses de enzimas reconhecidas até o momento, todos eles em bactérias Gram-negativas. A subclasse AAC(3)-II inibe à gentamicina, netilmicina, tobramycina e sisomicina. Entre elas, a variante AAC(3')-IIa tem sido achada em plasmídeos que contêm o gene que codifica a enzima CTX-M-15 junto com outros determinantes de resistência a antibióticos em isolados de *E. coli* (WOODFORD et al. 2009; RAMIREZ & TOLMASKY 2010)

As AAC(6') são as EMAs mais frequentes e importantes, já foram encontradas em plasmídeos e cromossomos e estão disseminadas entre patógenos Gram-negativos e Gram-positivos. Entre elas, as enzimas AAC(6')-I são as mais encontradas e conferem resistência à amicacina, tobramicina, netilmicina, kanamicina, entre outros. Até o presente, pelo menos 28 genes que codificam variantes de AAC(6')-I foram descritos, e a enzima AAC(6')-Ib variantes **cr** (*ciprofloxacin resistance*), é uma variante nova que inclui as fluoroquinolonas como substrato (ciprofloxacina e norfloxacina) por modificação de dois aminoácidos diferentes de sua sequência original, Trp102Arg e Asp179Tyr, os quais demonstram serem necessários e suficientes para promover a acetilação em fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (ROBICSEK et al. 2006; RAMIREZ & TOLMASKY 2010).

1.7 Tipagem molecular

Atualmente inúmeros métodos são utilizados com o propósito de caracterizar geneticamente espécies de microrganismos. Dentre os quais cita-se os métodos de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

1.7.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A PFGE é considerada como uma ferramenta “padrão ouro” para a análise da estrutura filogenética de populações bacterianas por analisar o DNA completo. A diversidade de cepas de uma determinada espécie pode ser estudada por esta técnica, já que gera um perfil molecular facilmente interpretado, característico de cada cepa. O princípio desta técnica consiste na separação de fragmentos de DNA de alto peso molecular, obtidos pela digestão do DNA genômico da bactéria com enzimas de restrição, e separação destes fragmentos utilizando a corrente

eletroforética, o que permite que fragmentos de DNA com alto peso molecular se separem de melhor maneira em um gel de agarose (MAGALHÃES et al. 2005).

1.7.2 Multilocus Sequence Typing (MLST)

O método de MLST é amplamente utilizado para diferenciação filogenética de espécies bacterianas. Esta técnica é baseada em sequenciamento de fragmentos internos de um limitado número de genes, geralmente de 5 ou 7, denominados de genes *housekeeping*, localizados no cromossomo bacteriano. Estes genes evoluem lentamente e podem mostrar um alto grau de variabilidade entre bactérias relacionadas a fim de distinguir subespécies ou cepas (MAIDEN 2006, NDOYE et al. 2011).

Como se baseia em sequências de nucleotídeos, o MLST é altamente discriminatório e reprodutível com resultados que são diretamente comparáveis entre laboratórios. Para uma abordagem padronizada dos resultados, dados de MLST estão disponíveis na internet onde são gerenciados por Universidades e instituições de pesquisa, como por exemplo Instituto Pasteur. Desta forma a nomenclatura é uniformizada e disponibilizada para os usuários do banco de dados.

Estas duas técnicas de tipagem molecular procuram determinar se as amostras bacterianas são relacionadas epidemiologicamente ou possuem um precursor comum. Desta forma, estudos utilizando estas técnicas permitem uma melhor compreensão sobre os mecanismos evolutivos de um microrganismo.

1.8 Justificativa

As ITUs causadas por *E. coli* estão entre as infecções bacterianas mais comuns, tanto na comunidade como em hospitais, e são uma das principais causas de morbidade e custos associados à saúde no mundo inteiro. Na maioria das unidades de saúde públicas ou privadas do Equador, o tratamento é geralmente iniciado empiricamente, e muitas vezes, de maneira inadequada, como na bacteriúria assintomática e nos casos de patologias não infecciosas que cursam com sintomas miccionais irritativos e com urinocultura negativa. Aliado à isso, a automedicação dos pacientes, realizando o tratamento erroneamente, acabam por selecionar cada vez mais os agentes infecciosos resistentes.

A *E. coli*, principal agente causador da ITU, está ligada à resistência aos medicamentos utilizados como primeira escolha no tratamento empírico das infecções urinárias. Estudos atuais demonstram a crescente resistência de *E. coli* a vários grupos de antibióticos, principalmente, β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, relacionados à presença de determinantes genéticos de resistência e clones multirresistentes denominados *Multi Drug Resistant* (MDR) ou *Pan Drug Resistant* (PDR). Assinala-se que este fenômeno de multirresistência tem tido grande impacto em saúde pública pela limitação na escolha de drogas para o tratamento.

Atualmente no Equador não temos estudos de caracterização genética de resistência em *E. coli* de origem urinária. Isto enfatiza a importância de abordar e desenvolver este projeto de pesquisa, com aplicação de ferramentas moleculares como PCR, PFGE e MLST para identificar determinantes genéticos de resistência ligados aos principais grupos de antibióticos utilizados no tratamento empírico das ITUs e genotipagem molecular. Além de verificar a relação dos clones bacterianos com os determinantes genéticos de resistência, espalhados no meio comunitário e hospitalar. Desta forma, entendemos que este trabalho vai ajudar a conhecer o perfil de resistência bacteriana em pacientes ambulatoriais e hospitalares com infecções do trato urinário, e torná-lo acessível ao domínio público. Nós acreditamos que estes resultados vão ser fundamentais para ações de monitoramento de resistência, e também conscientizar os profissionais de saúde, principalmente médicos, para uma prescrição correta dos antibióticos, e ajudar na iniciativa para evitar a livre venda dos antibióticos, procurando reduzir o seu uso irracional.

Ressalta-se também que a resistência aos antibióticos é um problema multifatorial, com implicações microbiológicas, terapêuticas, epidemiológicas e de saúde pública; que vão de acordo com os objetivos da Pós-graduação de Medicina Tropical, dentro do controle epidemiológico e de saúde pública nas doenças infecciosas e parasitárias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer as características fenotípicas e moleculares de resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* recuperados de pacientes com infecção urinária, da cidade de Quito – Equador.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Determinar o perfil fenotípico de resistência de *Escherichia coli* aos antibacterianos usados no Equador para tratamento empírico das infecções do trato urinário.
- ❖ Realizar a classificação dos grupos filogenéticos de *Escherichia coli* por técnicas moleculares como PCR.
- ❖ Pesquisar a presença dos genes codificadores das β -lactamases tipo *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} *bla*_{AMPC} através de técnicas moleculares como PCR e sequenciamento genômico.
- ❖ Pesquisar a presença dos genes codificadores das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos – EMAs, subclasse AAC(3)-IIa, ANT(2'')-Ia, AAC(6')-Ib e genes 16S-rRNA metilases, através de técnicas moleculares como PCR e sequenciamento genômico.
- ❖ Pesquisar a presença dos genes determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos – PMQR, variantes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr*, através de técnicas moleculares como PCR e sequenciamento genômico.
- ❖ Determinar presença de integrons classe I, através de técnicas moleculares como PCR e sequenciamento genômico, com análise da região variável.
- ❖ Realizar multilocus sequence typing (MLST) aos isolados com presença de genes codificadores das β -lactamases *bla*_{CTX-M-15}, procurando o clone pandêmico de *E.coli* ST-131.

- ❖ Avaliar o polimorfismo genético das amostras de *E. coli* uropatogênica, através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo epidemiológico observacional, descritivo e transversal (seccional), para determinar a frequência e caracterizar os determinantes de resistência aos antibióticos utilizados como primeira escolha no tratamento empírico das ITU, conjuntamente com a avaliação do polimorfismo genético das cepas de *E. coli* de origem urinária.

3.2 Coleta e transporte das amostras

Foram analisadas 156 amostras de *E. coli* estocadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Investigação em Saúde Pública (INSPI) - “Dr. Leopoldo Izquieta Perez”, Regional Norte, na cidade de Quito – Equador, no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2011. As 156 amostras de *E. coli* foram recuperadas de pacientes com infecção urinária, dos quais, 36 amostras foram de origem hospitalar, provenientes de pacientes internados em diferentes hospitais da cidade de Quito, e 120 amostras foram de origem comunitária provenientes das unidades médicas da rede de atenção de saúde pública. Todas as amostras estocadas apresentaram contagem de bactérias igual ou superior a 10^5 UFC/mL, e foram identificadas através de testes bioquímicos convencionais, sendo realizados também testes de aos antibióticos usados no tratamento das infecções urinárias. As 156 cepas de *E. coli* uropatogênicas selecionadas apresentavam resistência para dois ou mais antibióticos testados. Não foi possível obter a maioria dos dados dos pacientes, por que só temos os registros do laboratório.

Para o transporte das amostras do Laboratório do INSPI na cidade de Quito até o Laboratório de Pesquisa em Infecções Hospitalar no IOC/FIOCRUZ, as cepas foram estocadas em meio de transporte de Ágar Nutriente em microtubos, empacotadas em embalagem com isolamento triplo e devidamente rotuladas, cumprindo com as normas de transporte recomendadas pela IATA. As embalagens usadas para o transporte foram indicadas pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio/IOC) e fornecidos pelo IOC/FIOCRUZ.

A obtenção das cepas de *E. coli* recuperadas de cultura de urina foi autorizada pela Direção do INSPI - “Dr. Leopoldo Izquieta Perez”, sob o documento Nº 01732-2011-DINHMT-RN, com data 26 de agosto do ano 2011. O transporte das cepas de Equador ao Brasil foi autorizado pela Subsecretaria Nacional de Vigilância e Controle Sanitário do Ministério de Saúde Pública do Equador, através do documento Nº 000228, com data de 24 de janeiro do ano 2012.

3.3 Identificação de *Escherichia coli*

No Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do IOC - LAPIH, as amostras foram semeadas em Ágar EMB (Ágar Eosina Azul de Metileno) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), meio de cultura adequado para a detecção e diferenciação de bactérias Gram-negativas. As placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas para o crescimento bacteriano. Foram analisadas a morfologia e a coloração apresentadas pelas colônias, observando-se na maioria o brilho metálico esverdeado característico das colônias de *E coli*. (**Figura 3.1**).

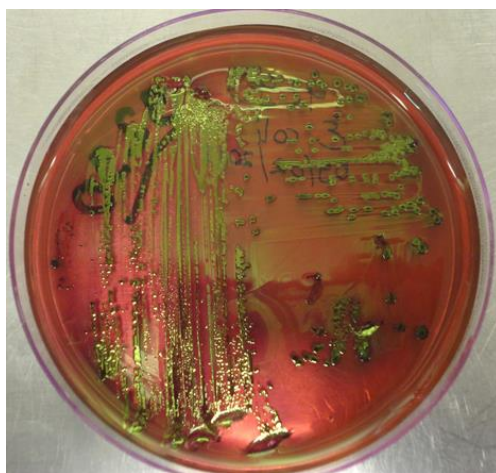


Figura 3.1 Morfologia das colônias de *E. coli*. **Fonte**, LAPIH

Uma das colônias de cada placa foi selecionada para ser submetida às seguintes provas bioquímicas básicas de identificação para Enterobactérias: fermentação de glicose, lactose, sacarose e produção de gás visualizadas no meio de TSI (Ágar-Ferro-Triplo Açúcar) (Oxoid, Inglaterra); prova da mobilidade, produção de H₂S e produção de Indol, visualizadas no meio de SIM (Sulfato-Indol-Motilidade) (Oxoid, Inglaterra); prova de utilização do citrato como fonte de carbono realizada no Ágar Citrato de Simmons (Oxoid, Inglaterra); prova de produção de urease no meio de Ágar Uréia (Oxoid, Inglaterra); prova da Oxidase (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil)

(Figura 3.2). Após as sementeiras nestes meios, incubou-se novamente e colocou-se na estufa a 37°C durante 18 a 24 horas, para serem lidas no próximo dia, confirmando-se a identificação. Para o controle de qualidade dos testes foi realizado utilizando a cepa padrão *E. coli* ATCC® 25922.

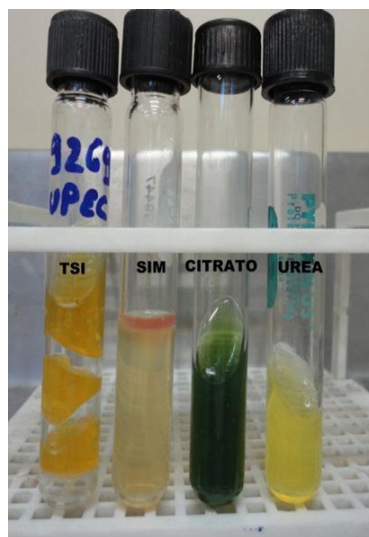


Figura 3.2 Testes bioquímicos de identificação de *E. coli*.

Fonte, LAPIH

Depois de serem identificadas, cada cepa foi preservada no meio de caldo de BHI acrescido com 20% de glicerol e armazenados em nitrogênio líquido e no freezer a -20°C.

3.4 Seleção das amostras.

Os testes fenotípicos de resistência antibiótica e a produção de β -Lactamases de amplo espectro estendido (ESBL) foram realizadas nas 156 amostras de *E. coli* de origem urinária. Entretanto, 101/156 isolados foram escolhidos para a realização dos procedimentos de identificação molecular de determinantes de resistência genética e as técnicas de genotipagem. Estas 101 amostras foram aquelas com produção de ESBL e resistência fenotípica à ciprofloxacina, amicacina e gentamicina.

3.5 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

A susceptibilidade dos microrganismos isolados foi testada através de difusão em ágar (disco-difusão), seguindo-se as recomendações do *Clinical and Laboratory*

Standards Institute (CLSI, 2013). Para os testes de difusão em ágar, uma alçada das colônias do meio de TSI foi transferida para uma solução salina e a suspensão foi comparada com o padrão de turvação 0,5 da escala de Mac Farland. Em seguida, foi realizada a semeadura no meio de ágar Muller-Hinton e os discos de antibióticos (Oxoid, Inglaterra) próprios para bactérias Gram-negativas foram introduzidos (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1 Antibióticos utilizados no teste de sensibilidade

Antibióticos	Concentração (ug)
Amoxicilina/ ácido clavulânico	20/10
Ampicilina	10
Aztreonam	30
Cefalotina	30
Cefepime	30
Cefotaxima	30
Cefoxitina	30
Ceftazidima	30
Ciprofloxacina	5
Ertapenem	30
Gentamicina	10
Amikacina	30
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1,25/23,75

As placas foram colocadas em estufa a 35°C durante 16 a 18 horas. O resultado do teste de difusão em ágar para a avaliação da resistência aos antibióticos foi obtido através da medida do halo de inibição de crescimento provocado pelos discos de antibióticos colocados nas placas semeadas. De acordo com o diâmetro do halo de inibição, foi possível verificar a sensibilidade, resistência intermediária ou resistência aos antibióticos testados. Os diâmetros da zona de inibição são particulares para cada droga e microrganismo, sendo comparados com os diâmetros padronizados pelo CLSI 2013. É importante ressaltar que os resultados de resistência intermediária foram considerados como resistentes e foram analisados conjuntamente com as cepas que apresentaram resistência (**Figura 3.3**). Como controle do teste foram utilizadas as amostras *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 35218.

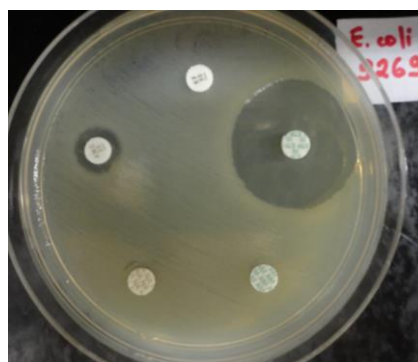


Figura 3.3 Antibiograma realizado pelo método de difusão em ágar.

Fonte, LAPIH

3.6 Detecção fenotípica de ESBL e AmpC

Para a detecção fenotípica de ESBL foi empregado o teste de JARLIER (1988) e as recomendações do CLSI 2013. No teste de Jarlier, o preparo da suspensão e o inóculo em placa Agar Muller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) são realizados da mesma forma como no teste de susceptibilidade descrito anteriormente. Foi colocado no centro da placa um disco de amoxicilina/ácido clavulânico (AMC 20/10 µg) e no entorno do disco de AMC foram colocados discos de ceftazidima (CAZ 30 µg), cefotaxima (CTX 30 µg), cefepime (FEP 30 µg) e aztreonam (ATM 30 µg) a 2 cm de distância. Foi acrescentado o disco de cefoxitina (FOX 30 µg) para detecção de β-lactamase AmpC. As placas foram colocadas na estufa a 35°C por 16 a 18 horas. Após a incubação foi realizada a leitura.

A suspeita de produção de ESBL foi dada pela resistência ou diminuição dos halos de inibição para cefalosporinas de amplo espectro CTX, CAZ e ATM seguindo a recomendações do CLSI 2013 (**Tabela 3.2**) e pelo efeito sinérgico produzido entre as cefalosporinas de amplo espectro e/ou monobactâmicos (ATM) com o disco de amoxicilina/ácido clavulânico, estrategicamente colocado (**Figura 3.4-A**). Como controle do teste foi utilizada a cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Tabela 3.2 Halos de inibição sugestivos de ESBL para *E. coli* (CLSI, 2013)

Antibiótico	Concentração dos discos	Interpretação convencional dos halos de inibição (mm)			Halos sugestivos de ESBL
		R	I	S	
Aztreonam	30 ug	≤15	16-21	≥22	≤27 mm
Cefotaxima	30 ug	≤14	15-22	≥23	≤27 mm
Ceftazidima	30 ug	≤14	15-17	≥18	≤22 mm

A produção da β -lactamase tipo AmpC foi sugerida pela sensibilidade intermediária ou resistência à cefoxitina (FOX), amoxicilina/ácido clavulânico, e/ou cefalosporinas de terceira geração, junto com sensibilidade a cefepime (FEP). O aztreonam é um inibidor da β -lactamase tipo AmpC, interrompendo a continuidade do halo de resistência à cefoxitina, sendo este um critério de suspeita de produção desta β -lactamase. É importante indicar que os isolados produtores de AmpC plasmidial apresentam colônias dispersas pelos bordos dos halos de inibição do aztreonam (**Figura 3.4-B**).

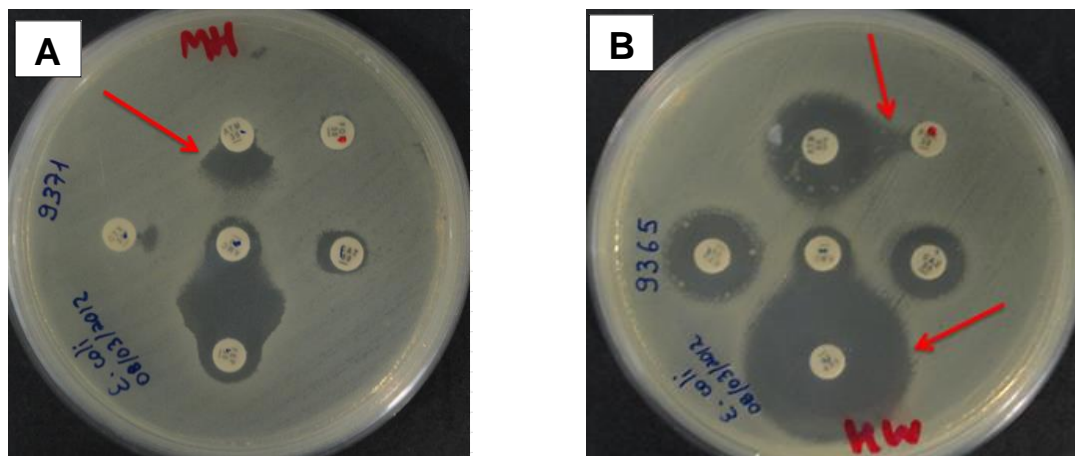


Figura 3.4 Detecção fenotípica de ESBL (A) e AmpC (B).

ATM, aztreonam; FOX, cefoxitina, CTX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima, FEP, cefepime; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico). **Fonte**, LAPIH.

3.7 Quantificação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM é a concentração mínima de um antibiótico necessária para inibir o crescimento bacteriano de 10^5 UFC/ μ L de um microrganismo após a inoculação e incubação. Para a determinação da CIM, o preparo da suspensão e o inóculo em placa de Ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) são realizados da mesma maneira como no teste de susceptibilidade descrito anteriormente. Usaram-se tiras de Etest (BioMérieux, São Paulo, Brasil) para o diagnóstico *in vitro*, contendo os antibióticos cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacina e gentamicina em diferentes gradientes de concentração (0,016 – 256 μ g/mL), em isolados que apresentarem resistência a estes antibióticos. As tiras foram colocadas nas placas e incubadas na estufa a 35°C por 16 a 18 horas. Após a incubação foi realizada a leitura da área de inibição elíptica dos antibióticos (**Figura 3.5**). Para a interpretação dos resultados, usaram-se as recomendações do CLSI 2013 (**Tabela 3.3**).

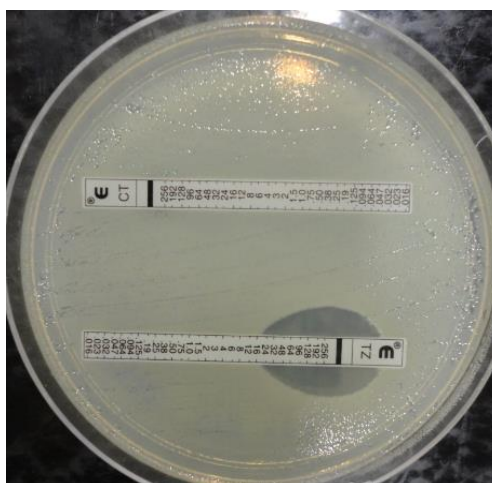


Figura 3.5 Avaliação do CIM para cefotaxima(CT) e ceftazidima(TZ). **Fonte,** LAPIH.

Tabela 3.3 Critérios para a concentração inibitória mínima, CLSI 2013

Antibiótico	CIM, Critérios de interpretação µg/mL		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ceftazidima	≤ 4	8	≥ 16
Cefotaxima	≤ 1	2	≥ 4
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16

CIM, Quantificação da concentração inibitria mínima

3.8 Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método do tiocianato de guanidina (CAETANO-ANOLLES & GRESSHOFF 1997). Uma colônia de cada amostra proveniente de ágar *Muller-Hinton* foi inoculada em 3 ml de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (DIFCO [Interlab, São Paulo, Brasil]) com agitação por 18 horas a 37°C para obter o crescimento bacteriano. Ao segundo dia, as bactérias do caldo BHI foram transferidas para um microtubo e centrifugadas a 11.180g por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Adicionou-se 1ml de NaCl 1M no *microtubo*, agitando-se no vórtex para ressuspender o sedimento. Centrifugou-se novamente eliminou-se o sobrenadante (este processo foi repetido por duas vezes). O sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (TRIS-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0,1 mM pH 8.0), ambos da marca SIGMA (Califórnia, Estados Unidos]. Posteriormente adicionou-se 500µL de solução de guanidina e homogeneizou-se por inversão (aproximadamente 20 vezes). Após este procedimento, foi feita a incubação a -20°C por 5 minutos. Adicionou-se 500 µL de solução de Clorofórmio-

Álcool-Isoamílico. Feita a agitação no vórtex até homogeneizar e obter-se uma solução leitosa, centrifugou-se a 11.180g por 10 minutos. Retirou-se 750uL da parte superior da solução centrifugada e transferiu-se a um novo microtubo que continha 380uL de isopropanolol. Os tubos foram deixados no *freezer* a -20 °C por 18 horas. No terceiro dia, a solução foi centrifugada a 11.180g por minuto e o sobrenadante desprezado. Seguiu-se com a adição de 150uL de álcool 70% e centrifugação nas mesmas condições, desprezando-se o sobrenadante (repetiu-se por 2 vezes). O último sobrenadante foi desprezado, permitindo-se que o “*pellet*” secasse naturalmente à temperatura ambiente no microtubo. Como último passo, o “*pellet*” foi dissolvido em 100uL de TE (TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0) e incubado em estufa ou banho-maria a 37°C por 3 horas. O DNA extraído foi finalmente acondicionado a -20 °C.

Realizou-se a quantificação do DNA extraído de todas as amostras, em espectrofotômetro “GeneQuant *pro*”, usando a cubeta 80-2103-69, com diluição de amostra de 1/10, calibração (*pathlength* 5mm; unidades, ng/uL), obtendo-se a concentração e pureza do DNA de cada amostra. Após a leitura das concentrações de DNA fez-se estoque de uma concentração de 25ng em 5uL (25ng/5uL). Um volume de 5uL, a partir do estoque de DNA, foi utilizado em cada reação de PCR.

3.9 Reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerasa)

Todos os genes foram inicialmente amplificados e sequenciadas para serem utilizadas como controles positivos em cada procedimento molecular.

3.9.1 Classificação filogenética

A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada em um volume final de 25uL. As reações individuais foram compostas de: 12,5uL de READYMIX SIGMA (California, Estados Unidos) (Buffer 10X, 25mM de MgCl₂, 0,2 mM DE dNTP, 0,75 U da enzima Taq polimerase), 15pmol de cada iniciador, 5,5uL de água deionizada e 25ng (5uL) de DNA obtido pelo método do tiocianato de Guanidina. As reações de PCR foram realizadas de forma individual para cada gene, usando o BIO-RAD T100™ Thermal cycler (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Os iniciadores utilizados na classificação filogenética estão apresentados na **tabela 3.4**.

Tabela 3.4. Iniciadores utilizados na classificação filogenética de *E. coli*

Genes		Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho (pb)	Referência Bibliográfica
<i>ChuA</i>	1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	CLERMONT et al. 2000
	2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>YjaA</i>	1	TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG	211	
	2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
<i>TspE4C2</i>	1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	
	2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

As condições de PCR foram: 1 ciclo de desnaturação inicial (94°C por 5 minutos); 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos (CLERMONT et al. 2000). Dois produtos (amostras) positivas para cada gene, *chuA*, *yjaA*, e *TspE4C2* foram purificados com GFX (GE, BioLab, Recife, Brasil) e sequenciados na Plataforma DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ.

Foi realizado PCR para o gene *chuA* a todas as 101 cepas com resistência fenotípica aos antibióticos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, o que permite distinguir entre os grupos B2 ou D. Nas cepas positivas para o gene *chuA*, foi realizada PCR para o gene *yjaA*, o que permite classificar as cepas positivas dentro do grupo filogenético B2 e as cepas negativas dentro do grupo filogenético D. Nas amostras negativas para *chuA* foi realizada PCR para o *TspE4.C2*, pois a presença deste fragmento de DNA permite classificar as cepas dentro do grupo filogenético B1 já a sua ausência permite classificá-las no grupo A.

3.9.2 Detecção de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M.}, *bla*_{CTX-M.-15}

Foi realizado PCR para todos os isolados com presença fenotípica de β -lactamases. As reações individuais, com volume final de 25uL, foram compostas de: Tampão de reação 1X (5uL); 1,5mM de MgCl₂ (1,5uL); 0,25mM de dNTP (1uL); 2,5U da enzima Taq polimerase (0,25uL); 20 pmol (1uL) de cada iniciador; 10,25uL de água deionizada e 25ng (5uL) de DNA. As reações de PCR foram realizadas de forma individual para cada gene, usando o BIO-RAD T100™ Thermal cycler (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Os iniciadores “primers” utilizados na amplificação das β -lactamases tipo ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M.}, *bla*_{CTX-M.-15}) estão

apresentados na **tabela 3.5**; e as condições de PCR para cada gene estão indicadas na **tabela 3.6**.

Tabela 3.5 Iniciadores utilizados nas reações de PCR para β -lactamases tipo ESBL

β -lactamases	Genes		Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho (pb)	Referência Bibliográfica
CTX-M	<i>bla</i> _{CTX-M}	F	ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGG	593 pb	MULVEY et al. 2003
		R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG		
SHV	<i>bla</i> _{SHV}	F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	797 pb	HASMÁN et al. 2005
		R	GATTTGCTGATTTGCTCGG		
TEM	<i>bla</i> _{TEM}	F	GCGGAACCCCTATTTG	859 pb	HASMÁN et al. 2005
		R	ACCAATGCTTAATCAGTGAG		
CTX-M-15	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F	GGAATCTGACGCTGGGTAA	875 pb	MENDONÇA et al. 2007
		R	AGAATAAGGAATCCCATGGTT		

Tabela 3.6 Condições de PCR para amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-15}

Gene	Condições de PCR.	Referência Bibliográfica
<i>bla</i> _{CTX-M}	Desnaturação inicial: 94°C / 5 minutos. 30 ciclos: desnaturação (94°C / 45 seg), anelamento (61°C / 45 seg) e extensão (72°C / 45 seg) Extensão final (72°C / 10 min)	MULVEY et al. 2003
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Desnaturação inicial: 94°C / 5 minutos 30 ciclos: desnaturação (94°C / 45 seg), anelamento (50°C / 45 seg) e extensão (72°C / 45 seg) Extensão final (72°C / 5 min)	MENDONÇA et al. 2007
<i>bla</i> _{SHV}	Desnaturação inicial: 94°C / 5 minutos 35 ciclos: desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (51°C / 1 min) e extensão (72°C / 1 min) Extensão final (72°C / 10 min)	HASMÁN et al. 2005
<i>bla</i> _{TEM}	Desnaturação inicial: 94°C / 5 minutos 35 ciclos: desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (53°C / 1 min) e extensão (72°C / 1 min) Extensão final (72°C / 10 min)	HASMÁN et al. 2005

Os produtos positivos dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-15} foram purificados com Kit GFX (GE, BioLab, Recife, Brasil) e sequenciados na Plataforma DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ.

3.9.3 Detecção do gene *bla*_{AMPc}.

Foi realizado PCR em todos os isolados com presenç a fenotípica de β -lactamases tipo AmpC. As reações individuais, com volume final de 25uL, foram

compostas de: 12,5uL de READYMIX SIGMA (Buffer 10X, 25mM de MgCl₂, 0,2 mM DE dNTP, 0,75 U da enzima Taq polimerase); 5,5uL de água deionizada; 25ng (5uL) de DNA obtido pelo método do tiocianato de guanidina; 6 pmol dos *primers* MOXM, CITM, DHAM; 5 pmol dos *primers* AACM, EBCM; e 4 pmol do *primer* FOXM. As reações de PCR foram realizadas de forma individual para cada gene, usando o BIO-RAD T100™ Thermal cycler (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Os iniciadores utilizados na amplificação da de β-lactamases tipo AmpC (*bla_{AMPC}*) estão apresentados na **tabela 3.7**.

Tabela 3.7 Iniciadores das reações de PCR para β-lactamases tipo AmpC

β-lactamase	Enzima	Primers	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho (pb)	Referência Bibliográfica
AMPC	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11	MOXMF MOXMR	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520	PÉREZ-PÉREZ & HANSON 2002.
	LAT-1 a LAT-4, CMY-2 CMY-7 BIL-1	CITMF CITMR	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462	
	DHA-1, DHA-2	DHAMF DHAMR	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	405	
	ACC	ACCMF ACCMR	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346	
	MIR-1 ACT-1	EBCMF EBCMR	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	302	
	FOX-1 a FOX-5b	FOXMF FOXMR	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190	

As condições de PCR para amplificação do gene *bla_{AMPC}* foram: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; 25 ciclos: 94°C por 30 segundos; 64°C por 30 segundos; 72 °C por 60 segundos; 1 ciclo de 72°C por 7 minutos para a extensão final.

Todos os produtos positivos para *bla_{AMPC}* foram purificados com Kit GFX (GE, BioLab, Recife, Brasil) e sequenciados na Plataforma DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC-FIOCRUZ com posterior análise das sequências no GenBank.

3.9.4 Detecção do gene *aac(6')-Ib-cr*

Foi realizado PCR em todos os isolados com resistência à ciprofloxacina. As reações individuais, com volume final de 25uL, foram compostas de: 12,5uL de READYMIX SIGMA (Buffer 10X, 25mM de MgCl₂, 0,2 mM DE dNTP, 0,75 U da enzima Taq polimerase); 5,5uL de água deionizada; 25ng (5uL) de DNA obtido pelo método do tiocianato de guanidina; 10pmol/uL (1uL) dos *primers* 1 e 2 (**Tabela 3.8**)

As condições de PCR para amplificação do gene *aac(6')-Ib-cr* foram: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos; 34 ciclos de 94°C por 45 seg, 55°C por 45 seg e 72°C por 45 seg; e 1 ciclo de 72°C por 30 segundos para extensão final.

Tabela 3.8 Iniciadores utilizados na amplificação de *aac(6')-Ib-cr*

Genes	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho (pb)	Referência Bibliográfica
1	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA		
2	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	PARK et al. 2006
Sequencing <i>cr</i>	CGTCACTCCATACATTGCAA		

Todos os produtos positivos para o gene *aac(6')-Ib* foram purificados com Kit GFX (GE Healthcare, Estados Unidos) e sequenciados com o oligonucleotideo 5'-CGTCACTCCATACATTGCAA para identificação do gene *aac(6')-Ib-cr*.

3.9.5 Detecção do gene *qnr*

Foi realizada a *multiplex-PCR* para todos os isolados com resistência à ciprofloxacina. As reações individuais, com volume final de 25uL, foram compostas de: 12,5uL de READYMIX SIGMA (Buffer 10X, 25mM de MgCl₂, 0,2 mM DE dNTP, 0,75 U da enzima Taq polimerase); 5,5uL de água deionizada; 25ng (5uL) de DNA obtido pelo método do tiocianato de guanidina; 20pmol/uL (1uL) do F e R dos *primers* de cada o gene. Os iniciadores “primers” utilizados na amplificação estão apresentados na **tabela 3.9**.

As condições de PCR para amplificação multiplex do gene *qnr* foram: Desnaturação inicial: 95°C/10 minutos; 35 ciclos de 95°C/1 minuto, 54°C/1 minuto e 72°C/1 minuto. Extensão final, 72°C/10 minutos

Tabela 3.9 Iniciadores utilizados nas reações de PCR para genes *qnr*.

Genes		Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho (pb)	Referência Bibliográfica
<i>QnrA</i>	F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580	CATTOIR et al. 2007
	R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>QnrB</i>	F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	
	R	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA		
<i>QnrS</i>	F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	
	R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		

A reação de *multiplex-PCR* foi aplicada aos setenta e nove isolados com resistência à ciprofloxacina, sem conseguir amplificar os genes *qnr*. Portanto procedeu-se com a amplificação individual de cada gene pesquisado (*qnr A, B, S*) através de reações de PCR. Todos os produtos positivos dos genes *qnr* foram purificados com Kit GFX (GE Healthcare, Estados Unidos) e sequenciados na Plataforma DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ.

3.9.6 Detecção dos genes *aac(3)-Ila*, *ant(2'')-Ia*

Foi realizado PCR a todos os isolados com resistência fenotípica à gentamicina e amicacina. As reações individuais, com volume final de 25uL, foram compostas de: Tampão de reação 1X (5uL); 1,5mM de MgCl₂ (1,2uL); 0,25mM de dNTP (0,5uL); 2,5U da enzima Taq polimerase (0,25uL); 15 pmol (1uL) de cada iniciador; 10,25uL de água deionizada e 25ng (5uL) de DNA. As reações de PCR foram realizadas de forma individual para cada gene, usando o BIO-RAD T100™ Thermal cyler (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Os iniciadores utilizados na amplificação estão apresentados na **tabela 3.10**.

As condições de PCR para amplificação dos genes foi: Desnaturação inicial: 94°C/2 minutos, 25 ciclos de 96°C/15 segundos, 55°C/30 e 70°C/3 minuto). Extensão final, 70°C/3 minutos.

Tabela 3.10 Iniciadores utilizados nas reações de PCR para *aac(3)-Ila*, *ant(2'')-Ia*

Genes		Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho (pb)	Referência Bibliográfica
<i>aac(3)-Ila</i>	aacC2 F	CGCTAAACTCCGTTACC	988 ^a	DÍAZ et al. 2004
	aacC2 R	TAGCACTGAGCAAAGCC		
<i>ant(2'')-Ia</i>	F	CGTCATGGAGGAGTTGGACT	734 ^b	
	R	CGCAAGACCTCAACCTTTTC		

^aGenBank: NG_047246.1 / ^bGenBank: NG_047387.1

Todos os produtos positivos dos genes pesquisados foram purificados com Kit GFX (GE Healthcare, Estados Unidos) e sequenciados na Plataforma DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ.

3.9.7 Detecção das 16S rRNA metilases

Foi realizado PCR para todos os isolados com resistência fenotípica à gentamicina e amicacina. As reações individuais, com volume final de 25uL, foram compostas de: 12,5uL de READYMIX SIGMA (Buffer 10X, 25mM de MgCl₂, 0,2 mM DE dNTP, 0,75 U da enzima Taq polimerase); 5,5uL de água deionizada; 25ng (5uL) de DNA obtido pelo método do tiocianato de guanidina; 10pmol/uL (1uL) do F e R dos *primers* de cada o gene. Os iniciadores “*primers*” utilizados na amplificação estão apresentados na **tabela 3.11**.

As condições de PCR para amplificação dos genes foram: Desnaturação inicial 94°C/3 minutos, 25 ciclos de 94°C/15 segundos; 45°C/30 segundos e 72°C/60 segundos. Extensão final 72°C/5 minutos.

Tabela 3.11 Iniciadores utilizados nas reações dos genes 16S-rRNA

Genes		Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho (pb)	Referência Bibliográfica
<i>armA</i>	F	TATGGGGGTCTTACTATTCTGCCTAT	774	FRITSCHÉ et al, 2008
	R	TCTTCCATTCCCTTCTCCTTT		
<i>rmtA</i>	F	CTAGCGTCCATCCTTTTCCTC	956	
	R	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC		
<i>rmtB</i>	F	TCAACGATGCCCTCACCTC	756	
	R	GCAGGGCAAAGGTAATCC		
<i>rmtC</i>	F	GCCAAAGTACTCACAAGTGG	845	
	R	CTCAGATCTGACCCAACAAG		
<i>rmtD</i>	F	CTGTTTGAAGCCAGCGGAACGC	443	
	R	GCGCCTCCATCCATTCGGAATAG		
<i>NpmA</i>	F	CTCAAAGGAACAAAGACGG	659	
	R	GAAACATGGCCAGAAACTC		

3.9.8 Detecção do Integron classe 1

Foi realizado PCR para todos os isolados para detecção do gene da integrase tipo 1-*intl*. As reações individuais, com volume final de 25uL, foram compostas de: Tampão de reação 1X (5uL); 1,5mM de MgCl₂ (1,2uL); 0,25mM de dNTP (0,5uL); 2,5U da enzima Taq polimerase (0,25uL); 20 pmol (125uL) de cada

iniciador; 10,75uL de água deionizada e 25ng (5uL) de DNA. As reações de PCR foram realizadas de forma individual para cada gene, usando o BIO-RAD T100™ Thermal cycler (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Os iniciadores utilizados na amplificação do gene *intl* e da região variável do integron estão apresentados na **tabela 3.12**.

As condições de PCR para amplificação dos genes *intl* foram: Desnaturação inicial 94°C/10 minutos, 35 ciclos de 94°C/60 segundos; 55°C/30 segundos 72°C/60 segundos. Extensão final 72°C/10 minutos.

Para todos os isolados positivos para *intl* foram realizadas um segundo PCR, para amplificação da região variável do integron. Com volume final de 25uL, foram compostas de: Tampão de reação 1X (5uL); 1,5mM de MgCl₂ (1,2uL); 0,25mM de dNTP (0,5uL); 2,5U da enzima Taq polimerase (0,25uL); 20 pmol (125uL) de cada iniciador; 10,75uL de água deionizada e 25ng (5uL) de DNA.

As condições de PCR para amplificação da região variável do integron foram: Desnaturação inicial: 94°C/5 minutos, a seguir 35 ciclos; desnaturação: 94°C/60 segundos; anelamento: 55°C/60 segundos; e extensão: 72°C/5 minutos. Extensão final, 72°C/5 minutos.

Tabela 3.12 Iniciadores utilizados nas reações para integron de classe 1.

Genes		Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho (pb)	Referência Bibliográfica
<i>Intl</i>	F	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variável	SANDVANG et al. 1997
	R	AAGCAGACTTGACCTGA		
<i>Região variável</i>	F(5'-CS)	GGCATCCAAGCAGCAAGC	Variável	SANDVANG et al. 1997
	B(3'-CS)	AAGCAGACTTGACCTGAT		

3.9.9 Eletroforese em gel de agarose.

Todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose. Os géis foram preparados dissolvendo a agarose em um tampão TBE 0,4X de modo a obter-se uma concentração de 1,5%. Foram utilizados 6uL do produto amplificado de cada gene para esta análise. A eletroforese ocorreu a 90 V por 70 minutos em tampão TBE 0,4X. Usou-se peso molecular de 100pb DNA *ladder* (GIBCO BRL Life Technologies). Foram corados em brometo de etídio (0,5ug/ml) durante 15 minutos e

descolorados em água por mais 15 minutos, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados, utilizando-se o equipamento Image Quant 300 (GE- Healthcare, Estados Unidos).

3.10 Tipagem molecular para caracterização de *E. coli*.

3.10.1 Análise do polimorfismo do DNA genômico (PFGE)

Com o objetivo de avaliar o polimorfismo genético das amostras de *E. coli* de origem urinária através de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), foram selecionadas todas as amostras com produção fenotípica de ESBL, e resistência à fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Foi processado e analisado um total de 101 amostras.

As amostras foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubados a 37°C por 24 horas para crescimento bacteriano. Após a incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana, adicionando 1 mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8.0; TRIS-HCl 1M pH 8) até alcançar o padrão de turvação 3 da escala de Mac Farland. Em seguida, 200uL da suspensão foram transferidos para microtubos contendo 5uL de proteinase K (50mg/uL). Foram adicionados à suspensão de células 200uL de agarose 1% (0,1g de agarose *low melting*, 0,5 mL de SDS 1%; 9,4 mL de TE [TRIS-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0,1 mM Ph 8.0]). Esta mistura é homogeneizada e distribuída em molde. Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano (*insertos*), os mesmos foram transferidos para tubos tipo *falcon* contendo 2 ml de solução de lise (NaCl 1M, TRIS-HCl 6mM pH 7.6, EDTA 100 mM pH 8.0, BRIJ-58 0,5%, desoxicolato 0,2%, sarcosina 0,5%, lisozima 1mg/mL) e 5 uL de proteinase K (50mg/uL) e incubados em banho maria a 50°C por 2 horas. Após a incubação, os blocos foram lavados 3 vezes com 10mL de água deionizada a 50°C por 15 minutos e uma vez com 8mL de tampão TE a 50°C por 15 minutos. Finalmente os insertos foram deixados nos tubos tipo *falcon* com 2mL de TE e guardados na geladeira.

Os blocos foram transferidos para microtubos contendo solução de tampão da enzima *Xba*I (90 uL de água deionizada e 10 uL de solução de tampão da enzima) e incubada a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, os insertos foram tratados com enzima de restrição *Xba*I (40U) (Roche / Fermentas) por 3 horas a 37°C. Os

fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 1,1% preparado em TBE 0,4X (TRIS 44,5 mM ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3), através de eletroforese de campo pulsado, utilizando-se o sistema CHEFF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente 0,5 a 35 segundos, por 16 horas a 6V/cm, na temperatura de 14°C. Foram utilizados padrões de peso molecular Lambda DNA *Leader pulse* (50-1000 Kb – Sigma) em cada corrida.

Após as corridas, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados, utilizando-se ferramentas de fotodocumentação Image Master VDS (Pharmacia Biotech). As análises dos géis e a confecção dos dendrogramas foram realizadas com o *software GelCompar II* (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de *Dice* (Opt:1,5%) (Tol:1,5% - 1.5%). Finalmente os resultados obtidos pela técnica de PFGE foram analisados de acordo com os critérios de TENOVER et al. (1995).

3.10.2 Multilocus sequence typing (MLST)

Com o objetivo de procurar a presença do clone padêmico ST131-*E. coli* produtor de CTX-M-15, foi realizado MLST em todas as amostras que apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-15}.

Um total de 17 amostras de *E. coli* de origem urinária positivas para o gene *bla*_{CTX-M-15} foram analisadas, utilizando a Plataforma do Instituto Pasteur, Paris, França. As análises de PCR foram feitas com cada par de *primers*, com volume final de 25uL, compostas de: Tampão de reação 1X (5uL); 1,5mM de MgCl₂ (1,2uL); 0,25mM de dNTP (0,5uL); 2,5U da enzima Taq polimerase (0,25uL); 15 pmol (1uL) de cada iniciador; 10,25uL de água deionizada e 25ng (5uL) de DNA. As reações de PCR foram realizadas de forma individual para cada gene, usando o BIO-RAD T100™ Thermal cycler (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos).

As condições de PCR para amplificação dos genes foi: Desnaturação inicial: 94°C/5 minutos, a seguir 30 ciclos; desnaturação: 94°C/45 segundos; anelamento: 55°C/45 segundos; e extensão: 72°C/45 segundos. Extensão final, 72°C/5 minutos.

Após a verificação da amplificação, os produtos da PCR foram purificados com Kit GFX (GE Healthcare, Estados Unidos) e sequenciados na Plataforma DNA-PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ. As

sequências foram analisadas para verificar o alelo de cada um dos genes. *Primers* com diferente sequência para amplificação foram utilizadas para o sequenciamento.

Para a análise do MLST, foram utilizadas ferramentas disponíveis no endereço eletrônico: <http://bigsdbs.pasteur.fr/ecoli/ecoli.html>. Estas ferramentas permitiram obter o alinhamento das sequências e o seu número correspondente (alelo). A combinação dos 8 alelos indicou as sequências tipo (*sequence type* - ST) e os complexos clonais (*clonal complex* – CC) de cada uma das cepas. Para obtenção da figura dos complexos clonais e análise dos STs, foi usado o programa *on line* e-Burst V3 (<http://eburst.mlst.net/>).

Os resultados de MLST obtidos pelo Esquema do Instituto Pasteur, referente aos alelos e sequências tipo, foram negativos para ST131. Entretanto não era esperada a dominância do clone ST43 pertencente ao CC43. Deste modo, após da revisão bibliográfica, todas as amostras positivas para o ST43 foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular Bacteriana da Universidade El Bosque, na cidade de Bogotá, Colômbia, para confirmar ou descartar a presença do clone ST131-B2 de *E. coli* produtora da enzima CTX-M-15, através de MLST pelo Esquema de Atchman, (University College Cork) (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi.html>).

3.11 Considerações éticas

O projeto foi revisto e aprovado pelo Comitê de Ética do IOC/FIOCRUZ com Resolução CNS 196/196. Registro do Projeto no CEP Fiocruz-IOC: 624/11.

4 RESULTADOS

4.1 Análises de dados dos pacientes

Foram coletados os dados dos 156 pacientes, os quais estavam registrados nos informes diários do Laboratório de Microbiologia do INSPI - “Dr. Leopoldo Izquieta Perez”. Os dados coletados de cada paciente foram: sexo, idade e origem (comunitária e hospitalar). As amostras de origem hospitalar são provenientes de sete hospitais, todos da cidade de Quito, com um total de 23,1% (36/156). Dentre estes, a maioria é procedente do Hospital Eugenio Espejo, com 58,3% (21/36). As amostras comunitárias são provenientes das Unidades de Saúde Pública e representam 76,9% (120/156) do total da amostragem. Na **Tabela 4.1** observa-se a classificação das amostras segundo a origem hospitalar.

Tabela 4.1 Distribuição das 36 amostras de origem hospitalar

Hospitais	36 (23,1%)
Hospital Eugenio Espejo	21
Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora	2
Hospital Gonzalo Gonzáles	3
Hospital San Lazaro	4
Hospital Regimiento Quito No1 – Policia	2
Hospital Militar	2
Hospital de Nanegalito	1
Hospital Jose Maria Velasco Ibarra	1

4.2 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade foram realizados nas 156 amostras. Os resultados possibilitaram estimar o percentual de susceptibilidade de *E. coli* uropatogênicas aos antibióticos utilizados na terapêutica das ITUs. Estes dados estabelecem critérios na escolha do antibiótico apropriado para o tratamento empírico nas infecções do trato urinário. Os resultados demonstram alta taxa de resistência para ampicilina, com 87,8% (137/156), trimetoprim/sulfametoxazol 77,5% (121/156), amoxicilina/ácido clavulânico 51(32.6%), ciprofloxacina 50,6% (79/156) e cefalotina 48,1% (75/156), o que sugere que estes antibióticos não devem ser considerados no tratamento empírico, sendo necessária a escolha de outros

antibióticos com percentagens de resistência menores ao 20%, segundo indicações dos especialistas.

A resistência também foi classificada de acordo com a origem das amostras, encontrando-se maiores percentagens de resistência nas amostras de origem hospitalar, principalmente amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina e trimetoprim/sulfametoxazol com percentagens de resistência acima de 55%. Quanto aos resultados dos testes de significância, há diferença estatística significativa entre as amostras hospitalares e comunitárias, principalmente na resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, cefotaxima, e ciprofloxacina. Todas as amostras hospitalares e comunitárias foram sensíveis para o carbapenêmico testado (ertapenem). Na **Tabela 4.2** observa-se a frequência de resistência nos ambientes comunitários e hospitalares aos antibióticos testados.

Tabela 4.2 Frequência de resistência antibiótica nos hospitais e na comunidade.

Antibiótico	Total (n=156) n(%)	Hospital (n=36) n (%)	Comunidade (n=120) n (%)	Valor de p
Amoxicilina/Ácido clavulânico	51 (32,6)	20 (55,6)	31 (25,8)	0.000855
Ampicilina	137 (87,8)	34 (94,4)	103 (85,5)	0.2734
Aztreonam	23 (14,7)	10 (27,8)	13 (10,8)	0.0119
Cefalotina	75 (48,1)	25 (69,4)	50 (41,7)	0.0034
Cefepime	12 (7,7)	6 (16,7)	6 (5,0)	0.0515
Cefotaxima	30 (19,2)	13 (36,1)	17 (14,2)	0.0034
Cefoxitina	12 (7,6)	4 (11,1)	8 (6,7)	0.6023
Ceftazidima	20 (12,8)	9 (25,0)	11 (9,2)	0.0272
Ciprofloxacina	79 (50,6)	27 (75,0)	52 (43,3)	0.000892
Ertapenem	0	0	0	-
Gentamicina	35 (21,7)	12 (33,3)	23 (19,2)	0.07487
Amicacina	9 (5,7)	4 (11,1)	5 (4,2)	0.1171
Trimetoprim/Sulfametoxazol	121 (77,5)	30 (83,3)	91 (75,8)	0.3441

Foi realizado o perfil de resistência entre os antibióticos β -lactâmicos, ciprofloxacina, gentamicina e trimetoprim/sulfametoxazol. Desta forma, observou-se perfis de resistência a dois ou mais antibióticos testados em várias cepas, principalmente aos antibióticos β -lactâmicos/SXT com 30,8% (48/156) e β -

lactâmicos/SXT/CIP com 22,4% (35/156). Como dado importante, salienta-se que a resistência para um antibiótico único, foi baixa (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3 Perfil de co-resistência aos antibióticos na comunidade e hospital.

Perfil co-resistência antibiótica	Isolados (n=156) n(%)	Hospital(n=36) n(%)	Comunitária (n=120) n(%)
B-lactâmicos	14 (8,9)	1 (2,7)	13 (10,8)
B-lactâmicos-CIP	9 (5,8)	3 (8,3)	6 (5,0)
B-lactâmicos-CN	2 (1,3)	0	2 (1,6)
B-lactâmicos -CN-CIP	4 (2,6)	2 (5,5)	2 (1,6)
B-lactâmicos -SXT	48 (30,8)	7 (19,4)	41 (34,2)
B-lactâmicos -SXT-CIP	35 (22,4)	12 (33,3)	23 (19,2)
B-lactâmicos -SXT-CN	5 (3,2)	1 (2,7)	4 (3,3)
B-lactâmicos -SXT-CN-CIP	23 (14,7)	9 (25,0)	14 (11,7)
CIP	3 (1,9)	0	3 (2,5)
SXT	7 (4,5)	0	7 (5,8)
SXT-CIP	5 (3,2)	1 (2,7)	4 (3,3)
SXT-CN-CIP	1 (0,6)	0	1 (0,8)
Total	156	36	120

CIP, ciprofloxacina; CN, gentamicina; SXT, trimetoprim/Sulfametoxazol

4.3 Detecção fenotípica de ESBL e AmpC

Das 156 cepas submetidas ao teste fenotípico, 22,4% (35/156) apresentaram um perfil de resistência com possível produção de β -lactamases de tipo ESBL e/ou AmpC. Na triagem fenotípica geral foram encontradas 14,7% (23/156) positivas para ESBL, 3,2%(5/156) positivas para AmpC e 4,5% (7/156) apresentaram co-resistência fenotípica. Na classificação pela origem (**Tabela 4.4**), das 35 amostras com produção fenotípica de ESBL 36,1% (13/36) foram hospitalares e 18,3% (22/120) foram comunitárias.

Tabela 4.4 Frequência fenotípica das β -lactamases nos hospitais e comunidade

β -lactamases n=35	Total n=156 n (%)	Hospitais (n=36) n (%)	Comunidade (n=120) n (%)
ESBL	23 (14,7)	9 (25)	14 (11,6)
AmpC	5 (3,2)	0 (0,0)	5 (4,2)
ESBL/AmpC	7 (4,5)	4 (11,1)	3 (2,5)
Total	35 (22,4)	13 (36,1)	22 (18,3)

ESBL (β -lactamases de espectro estendido)

Foi testada a resistência para as 35 cepas com produção fenotípica de ESBL, onde foram observados os seguintes resultados: Ampicilina 97% (34/35), ciprofloxacina 91% (32/35), trimetoprim/sulfametoxazol 89% (31/35), cefalotina 86% (30/35), cefotaxima 86% (30/35), amoxicilina/ácido clavulânico 83% (29/35), 66% (23/35), ceftazidima 57% (20/35), gentamicina 37% (13/35), cefoxitina 34% (12/35), cefepima 34% (12/35) e amicacina 20% (7/35). É importante destacar que todas as cepas produtoras de ESBL foram sensíveis para o carbapenêmico testado (ertapenem) (**Gráfico 4.1.**)

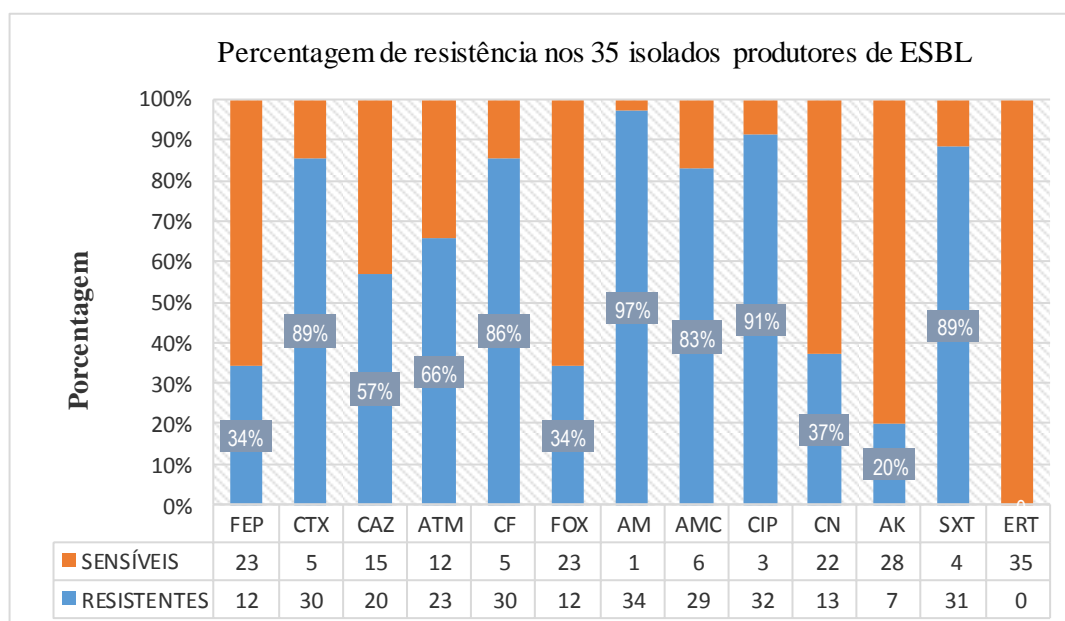


Gráfico 4.1. Percentagens de resistência nas cepas produtoras de ESBL.

FEP, cefepima; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; FOX, cefoxitina; AM, ampicilina; CF, cefalotina; ERT, ertapenem; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/Sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; CN, gentamicina, AK, amicacina.

4.4 Concentração Inibitória Mínima - CIM

A CIM foi determinada para todas as cepas que apresentaram resistência à cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacina e gentamicina. Para a interpretação dos resultados foram utilizadas as recomendações do CLSI 2013. Os resultados da CIM confirmam a resistência às (1) cefalosporinas de amplo espectro, como cefotaxima e ceftazidime, (2) antibióticos das fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, e (3) aminoglicosídeos como a gentamicina. Na **Tabela 4.5** estão apresentados os resultados do CIM para os antibióticos testados.

Tabela 4.5 Resultados da CIM dos isolados resistentes aos antibióticos testados

ug/mL	Cefotaxima n(%)	Ceftazidima n(%)	Ciprofloxacina n(%)	Gentamicina n(%)
< 1	0	0	3(3,7)	0
1	1(3,3)	0	0	0
2	3(10)	2(10)	9(11,3)	0
4	3(10)	0	0	3(8,8)
8	1(3,3)	6(30)	0	1(2,9)
16	3(10)	8(40)	13(13,4)	9(26,4)
32	1(3,3)	4(20)	54(68,4)	18(52,9)
64	1(3,3)	0	0	2(5,8)
128	0	0	0	0
> 256	17(56,6)	0	0	1(2,9)
TOTAL	30	20	79	0

4.5 Detecção dos determinantes genéticos de resistência.

4.5.1 Determinantes genéticos das β -lactamases

A detecção dos genes de resistência nos 35 isolados com produção de enzimas β -lactamases tipo ESBL e/ou AmpC foi feita pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os genes que codificam as principais enzimas (TEM, SHV, CTX-M, AMPC). Os produtos amplificados correspondem aos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AMPC}.

Os resultados da análise foram os seguintes: 68,6% (24/35) positivas para SHV; 37,1%(13/35) para TEM; 60%(21/35) para CTX-M;11,4%(4/35) para AmpC. Estes determinantes de resistência foram classificados de acordo com sua origem, em comunitárias de hospitalares (**Tabela 4.6**)

Tabela 4.6 Distribuição genotípica da β -lactamases pela origem.

β -lactamases	Total n=35	Hospitais(n=36) n(%)	Comunidade (n=120) n(%)
<i>bla</i> _{AmpC}	4 (11,4)	2 (5,6)	2 (1,7)
<i>bla</i> _{CTX-M}	21 (60,0)	10 (27,8)	11 (9,2)
<i>bla</i> _{SHV}	24 (68,6)	10 (27,8)	14 (11,7)
<i>bla</i> _{TEM}	13 (37,1)	3 (8,3)	10 (8,3)

Salienta-se que entre os 35 isolados que apresentaram positividade fenotípica para β -lactamases, em 91,4% (32/35) foram identificados genes codificadores de β -lactamases e 8,6% (3/35) foram negativos para estes genes, sugerindo que outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos, causando a resistência fenotípica nestes isolados.

Os 21 isolados positivos para o gene *bla*_{CTX-M} e os quatro para o gene *bla*_{AmpC} foram sequenciados, apresentando os seguintes resultados: no gene *bla*_{CTX-M}, 80,9% (17/21) foram caracterizados como *bla*_{CTX-M-15}; 14,3% (3/21) como *bla*_{CTX-M-14}, e 4,8% (1/21) como *bla*_{CTX-M-2}. Em relação ao gene *bla*_{AMPC}, todos (4/4) foram caracterizados como pertencente à classe *CMY-2* (**Tabela 4.7**)

Tabela 4.7 Resultados de sequenciamento *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{AmpC}

	CTX-M (n=21)			AmpC (n=4)
	<i>bla</i> _{CTX-M-15} n (%)	<i>bla</i> _{CTX-M-14} n (%)	<i>bla</i> _{CTX-M-2} n (%)	<i>CMY-2</i> n (%)
Cepas positivas	17 (80,9)	3 (14,3)	1 (4,8)	4 (100)

4.5.2 Determinantes genéticos de resistência à ciprofloxacina.

Na pesquisa dos determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR), todos os isolados investigados não apresentaram amplificação para os genes *qnrA* e *qnrS*, e 38 isolados apresentaram uma banda bem definida, com tamanho em torno de 470bp, do mesmo tamanho do gene *qnrB*. Entretanto, 16 amostras apresentaram características inespecíficas com fragmentos de DNA menos intensos e menos definidos. Entretanto, próximos à mesma posição do tamanho do gene *qnrB*. Posteriormente, procedeu-se o sequenciamento dos amplicons, os quais revelaram homologia com o gene *qnrB*, especificamente com o alelo *qnrB19*, em 48/54 amostras que apresentaram bandas de amplificação do DNA para o gene *qnrB*.

Na amplificação do gene *aac(6')-Ib*, 49 amostras apresentaram uma banda muito bem definida de aproximadamente 480pb. Os produtos foram enviados para a plataforma de sequenciamento com um terceiro primer específico para a variante *cr* do gene *aac(6')-Ib*, e os resultados revelaram homologia com o gene *aac(6')-Ib-cr* em quarenta e três isolados com perfil de resistência à ciprofloxacina.

Dos 79 isolados com resistência fenotípica, 27 apresentam expressão conjunta dos genes *qnrB19* e *aac(6')-Ib-cr*. Já em 15 isolados não foram identificados nenhum dos dois genes pesquisados, o que sugere outros mecanismos de resistência envolvidos. Estes dois genes estão disseminados na comunidade e nos hospitais. (**Tabela 4.8**).

Tabela 4.8 Determinantes de resistência genética à ciprofloxacina

Genes	Total n=79 n(%)	Hospital (n=36) n(%)	Comunidade (n=120) n(%)
<i>qnrB19</i>	48(60,8)	19 (52,7)	29 (24,2)
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	43(54,4)	19(52,7)	24 (20,0)

4.5.3 Determinantes de resistência aos aminoglicosídeos

Foi realizada a PCR nas 39 amostras que apresentaram resistência fenotípica aos aminoglicosídeos, para os genes *aac(6')-Ib*, *aac(3')-IIa*, *ant(2'')-Ia*, e os genes 16Sr RNA. Na amplificação do gene *aac(6')-Ib*, 29 isolados apresentaram uma banda definida em torno de 480pb, o qual foi confirmado com o sequenciamento. No gene *aac(3')-IIa*, 28 isolados apresentaram uma banda muito bem definida em torno de 980pb, e nos resultados do sequenciamento apresentaram homologia, confirmando a presença do gene pesquisado. Na pesquisa do gene *ant(2'')-Ia*, dois isolados apresentaram um produto com amplificação de fragmentos de DNA em torno de 730pb, o qual foi confirmado com o sequenciamento. Entre todos os isolados investigados, nenhum apresentou amplificação para os genes 16S rRNA.

Os genes amplificados foram encontrados nas amostras tanto de origem comunitária e hospitalar (**Tabela 4.9**). É importante salientar que os resultados de resistência fenotípica para amicacina foram somente encontrados em nove amostras. Entretanto o gene *aac(6')-Ib*, o qual confere resistência a este antibiótico, foi achado em vinte e nove cepas. Isto mostra que a presença de um determinante de resistência não garante a expressão de resistência para algum antibiótico.

Tabela 4.9 Determinantes de resistência genética aos aminoglicosídeos

Genes	Total n=39 n(%)	Hospital (n=36) n(%)	Comunidade (n=120) n(%)
<i>aac(6')-Ib</i>	29 (74,3)	12 (33,3)	17 (14,2)
<i>aac(3)-IIa</i>	28 (71,7)	8 (22,2)	20 (16,7)
<i>ant(2'')-Ia</i>	2 (5,1)	2 (5,5)	0
16S rRNA methylases	0	0	0

4.5.4 Detecção do integron de classe 1.

Neste trabalho, foram investigadas a presença do gene *intl* que codifica para a integrase tipo 1, presente em todos os integrons desta classe em 101 isolados de *E. coli* com perfis de resistência aos três grupos de antibióticos pesquisados.

Na amplificação do gen *intl*, 63,4% dos isolados (64/101) apresentaram amplificação de bandas definidas para a presença do gene pesquisado similar ao controle positivo. Em seguida, procedeu-se a amplificação da região variável destes sessenta e quatro isolados, segundo descrito nos materiais e métodos, observando que 31,7% (32/101) apresentaram amplificação de fragmentos de DNA muito definidas de diferentes tamanhos (*pb*) (**Figura 4.1**), os quais foram sequenciados com o intuito de conhecer que genes cassettes que estavam contidos na região variável do integron de classe 1. As análises do sequenciamento no GenBank revelaram a presença dos genes *drfA* e *aadA* principalmente, com as suas variantes genéticas, mostradas na **tabela 4.10**.

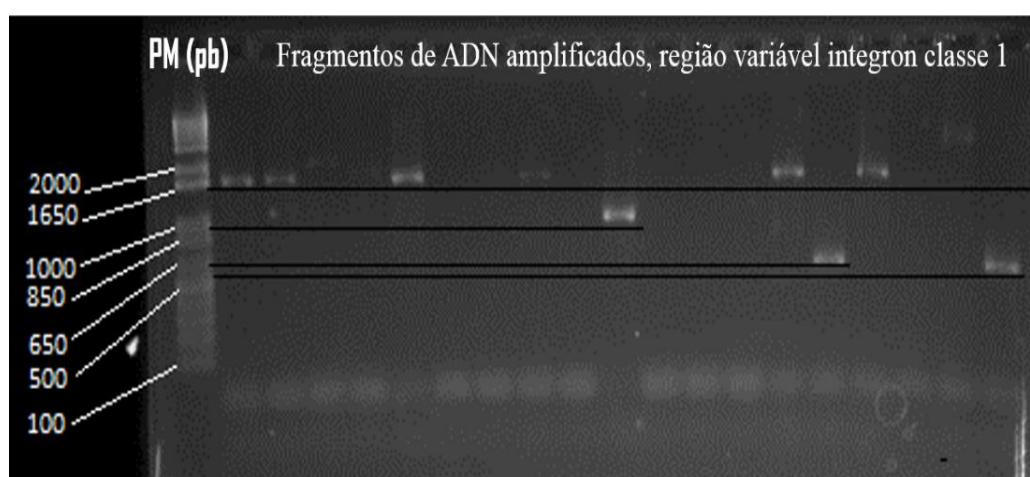


Figura 4.1 Amplificação de DNA na região variável do integron classe 1.

PM, peso molecular; pb, pares de bases. **Fonte**, LAPIH

Tabela 4.10 Genes na região variável do Integron classe1

Genes	Total n=32 N (%)	Hospital (n=36) n (%)	Comunidade (n=120) n (%)
<i>dfrA17</i>	18	7 (19,4)	11 (9,2)
<i>dfrA12</i>	4	1 (2,7)	3 (2,5)
<i>dfrA1</i>	3	0	3 (2,5)
<i>dfrA7</i>	2	0	2 (1,7)
<i>dfr2d</i>	3	1 (2,7)	2 (1,7)
<i>aadA5</i>	16	6 (16,7)	10 (8,3)
<i>aadA1</i>	3	0	3 (2,5)
<i>aadA2</i>	2	0	2 (1,7)
<i>aacA/aphD</i>	1	0	1 (0,8)
<i>catB3</i>	1	0	1 (0,8)

Finalmente, foi realizada a correlação dos genes expressos β -lactamases (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AMPC}), PMQR (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrB19*), EMAs (*aac(3')-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia*), genes 16S rRNA, e os genes cassettes da região variável do integron de classe 1 (**Tabela 4.11**). Foi encontrado maior correlação entre os grupos dos genes PMQR-EMAs com 21,7%(22/101); ESBL-PMQR-EMAs em 9,9%(10/101); ESBL-PMQR-EMAs-*dfrA17*, *aadA5* em 10,9%(11/101). Em dez isolados (9,9%[10/101]) com resistência fenotípica aos três grupos de antibióticos não foram achados nenhum gene pesquisado e não apresentou amplificação para a integrase *IntI* do integron classe 1.

Tabela 4.11 Perfis de correlação dos grupos de determinantes de resistência genética

Determinantes de resistência	Total n=101 n(%)
ESBL	3 (2,9)
ESBL, PMQR	1 (0,9)
ESBL, PMQR, EMA	10 (9,9)
ESBL, EMA	1 (0,9)
ESBL, PMQR, EMA, <i>dfrA17</i>	2 (1,9)
ESBL, PMQR, EMA, <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>	11 (10,9)
ESBL, PMQR, EMA, <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i>	1 (0,9)
ESBL, PMQR, <i>aadA2</i>	1 (0,9)
ESBL, PMQR, <i>dfrA12</i>	1 (0,9)
ESBL, <i>aadA1</i>	1 (0,9)
PMQR	11 (10,9)
PMQR, EMA	22 (21,7)
PMQR, EMA, <i>aacA/aphD</i> , <i>dfrA1</i> , <i>catB31</i>	1 (0,9)
PMQR, EMA, <i>dfrA12</i>	1 (0,9)
PMQR, EMA, <i>dfrA7</i>	1 (0,9)
PMQR, EMA, <i>dfr2d</i>	1 (0,9)
PMQR, EMA, <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>	3 (2,9)
PMQR, <i>dfr2d</i>	1 (0,9)
PMQR, <i>dfrA12</i>	1 (0,9)
PMQR, <i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i>	2 (1,9)
EMA	5 (4,9)
EMA, <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>	2 (1,9)
EMA, <i>dfrA7</i>	1 (0,9)
<i>dfr2d</i>	1 (0,9)
Não EBLs, PMQR, EMA, Integrons	10 (9,9)

ESBL, Betalactamase de espectro estendido; PMQR, Determinante de Resistência às Quinolonas Mediadas por Plasmídeo; EMA, Enzima Modificadora de Aminoglicosídeos.

4.6 Caracterização genética de *E. coli*

4.6.1 Classificação filogenética de *E. coli*

A classificação filogenética de *E. coli* de origem urinária foi realizada nas 101 cepas de *E. coli* com perfis de resistência fenotípica aos três grupos de antibióticos pesquisados, mediante a reação de PCR (descrita em Materiais e Métodos), para os genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4C2*. A presença ou ausência destes genes define o grupo

filogenético ao qual pertence cada isolado, como foi descrito anteriormente em Materiais e Métodos.

Os resultados da classificação filogenética de *E. coli* demonstram maior frequência do grupo B2 com 51,8% (52/101), depois o grupo A com 20% (21/101), grupo B1 com 16% (16/101) e o grupo D com 13% (13/101). O **Gráfico 4.2** mostra a classificação filogenética de cada uma das cepas de acordo com a presença ou ausência dos genes codificadores de resistência procurados no presente trabalho.

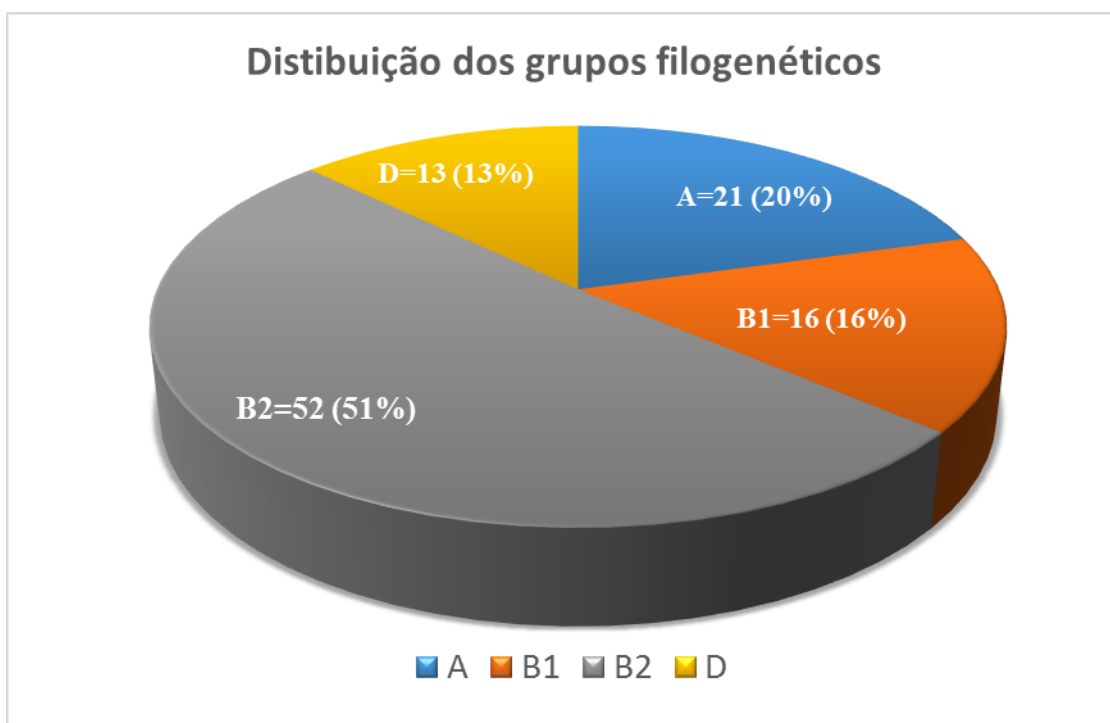


Gráfico 4.2 Classificação dos grupos filogenéticos de *E. coli*.

Foi realizada a correlação entre todos os determinantes genéticos de resistência encontrados neste estudo e os grupos filogenéticos A, B1, B2, D nos 101 isolados. Os resultados estão apresentados na **tabela 4.12**.

Tabela 4.12 Relação do perfil dos determinantes de resistência genética com os grupos filogenéticos

Determinantes genéticos de resistência aos antibióticos	Grupos filogenéticos				Total
	A n (%)	B1 n (%)	B2 n (%)	D n (%)	
ESBL	2 (10)		1 (1,9)		3
ESBL, PMQR				1 (7,6)	1
ESBL, PMQR, EMA	2 (10)	2 (12,5)	5 (9,6)	1 (7,6)	10
ESBL, EMA		1 (6,2)			1
ESBL, PMQR, EMA, <i>dfrA17</i>	1 (5)				1
ESBL, PMQR, EMA, <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>	5 (25)		4 (7,6)	3 (23,1)	12
ESBL, PMQR, EMA, <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i>			1 (1,9)		1
ESBL, PMQR, <i>aadA2</i>		1 (6,2)			1
ESBL, PMQR, <i>dfrA12</i>		1 (6,2)			1
ESBL, <i>aadA1</i>			1 (1,9)		1
PMQR	6 (30)	2 (12,5)	4 (7,6)		12
PMQR, EMA	1 (5)	6 (37,5)	16 (30,7)	2 (15,3)	25
PMQR, EMA, <i>aacA4</i> , <i>dfrA1</i> , <i>catB3</i>		1 (6,5)			1
PMQR, EMA, <i>dfrA12</i>			1 (1,9)		1
PMQR, EMA, <i>dfrA7</i>			1 (1,9)		1
PMQR, EMA, <i>dfr2d</i>			1 (1,9)		1
PMQR, EMA, <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>			3 (5,7)		3
PMQR, <i>dfr2d</i>				1 (7,6)	1
PMQR, <i>dfrA12</i>			1 (1,9)		1
PMQR, <i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i>	2 (10)				2
EMA			6 (11,5)		6
EMA, <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>			2 (3,8)		2
EMA, <i>dfrA7</i>				1 (7,6)	1
EMA, PMQR, <i>dfrA7</i>			1 (1,9)		1
<i>dfr2d</i>				1 (7,6)	1
Não EBLs, PMQR, EMA, Integrans	1 (5)	2 (12,5)	4 (7,6)	3 (23,1)	10
Total (n)	20	16	52	13	101

4.6.2 Análise do polimorfismo do DNA genômico

A eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi realizada em todas as cepas de *E. coli* de origem urinária que apresentaram resistência fenotípica para os antibióticos estudados, procurando clones comuns, e foram agrupados segundo o perfil fenotípico de resistência.

Os ensaios de PFGE geraram perfis nítidos (**figura 4.2**), o que permitiu realizar análises de possíveis similaridades genéticas dos isolados bacterianos, mas

eles foram agrupados segundo o perfil de resistência para antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas.

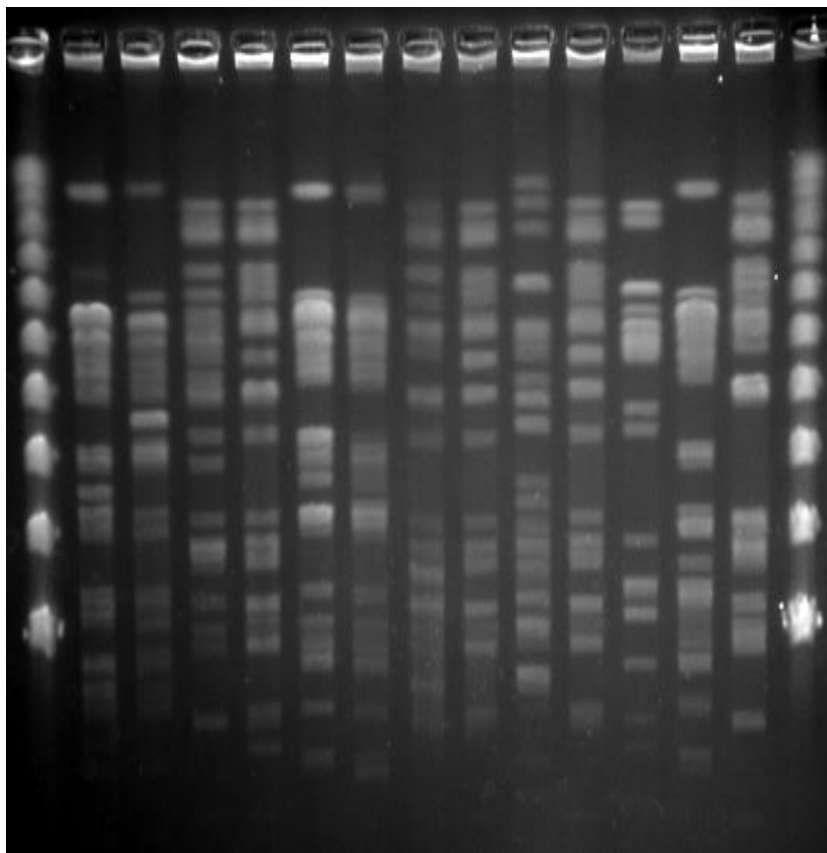


Figura 4.2 Gel com perfis de eletroforese em campo pulsado (PFGE). **Fonte**, LAPIH

Com o objetivo de mostrar a aplicabilidade do PFGE nas amostras de *E. coli* de origem urinária, dos ambientes comunitários e hospitalares, nosso estudo avaliou 39 amostras com resistência fenotípica aos aminoglicosídeos (Figura 4.3), 79 amostras com resistência à ciprofloxacina (Figura 4.4), e 35 amostras produtoras de β -lactamases (Figura 4.5). Os padrões de PFGE obtidos foram analisados de acordo com os critérios de TENOVER et al (1995). Nosso estudo revelou uma grande diversidade clonal entre os isolados clínicos não relacionados epidemiologicamente, com resistência a diferentes grupos de antibióticos. Este resultado já era esperado, devido ao fato destes isolados terem sido coletados em um intervalo de tempo prolongado (durante o ano 2011) e serem obtidos de pacientes com infecção urinária de origem comunitária na sua maioria.

Apesar da grande diversidade clonal entre as amostras não relacionadas epidemiologicamente, foi observada também a presença de padrões de PFGE com

porcentagens de similaridade acima do 85% entre as amostras não relacionadas epidemiologicamente (os critérios de Tenover apresentam um critério mais abrangente para classificação de novos clones). Isto demonstra a grande diversidade clonal espalhada na comunidade principalmente.

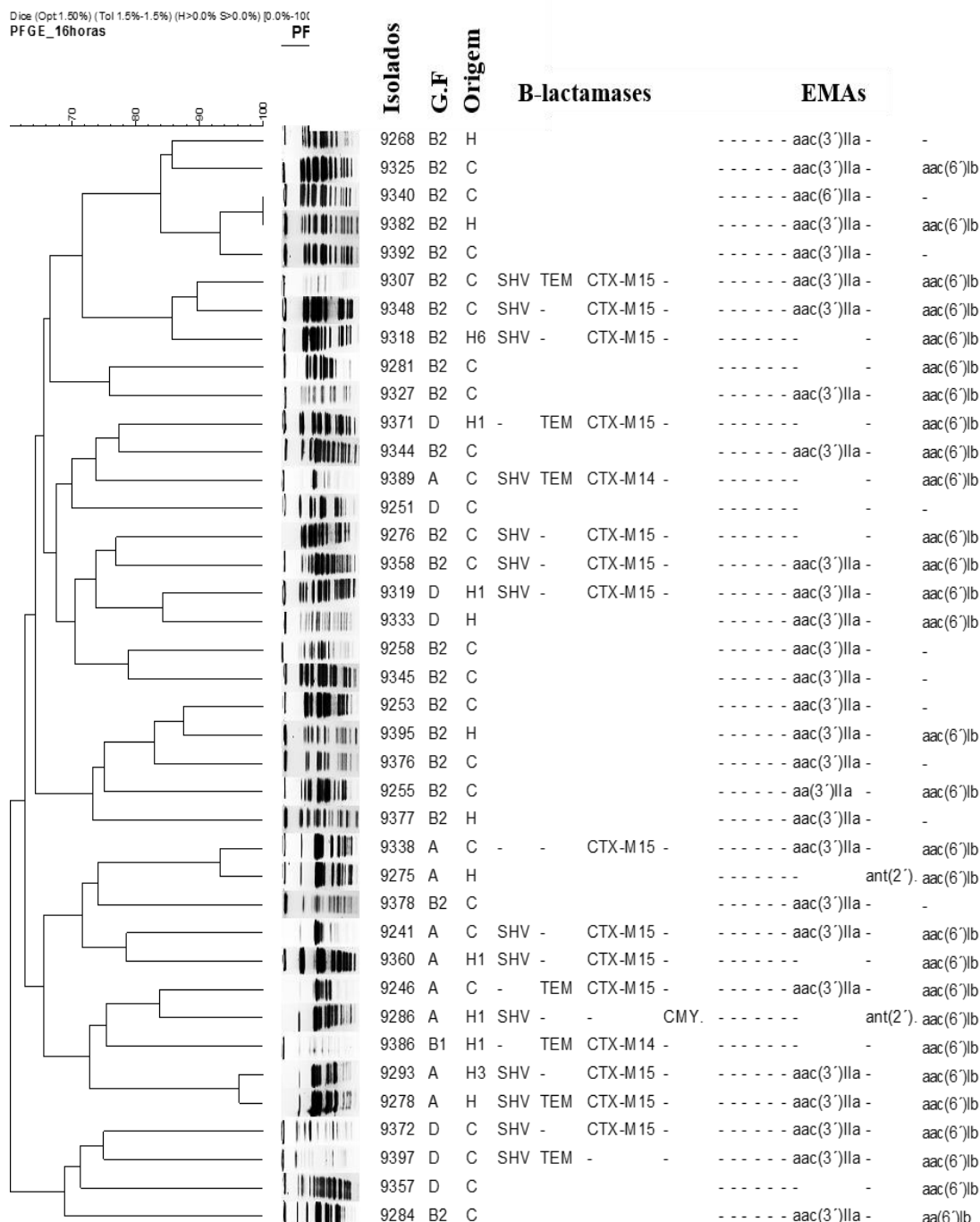


Figura 4.3. Dendrograma dos 39 isolados de *E. coli* resistentes aos aminoglicosídeos. GF, grupo filogenético; H1, hospital Eugenio Espejo; H3, hospital Gonzalo Gonzáles; H6, hospital Militar; C, comunidade. **Fonte,** LAPIH

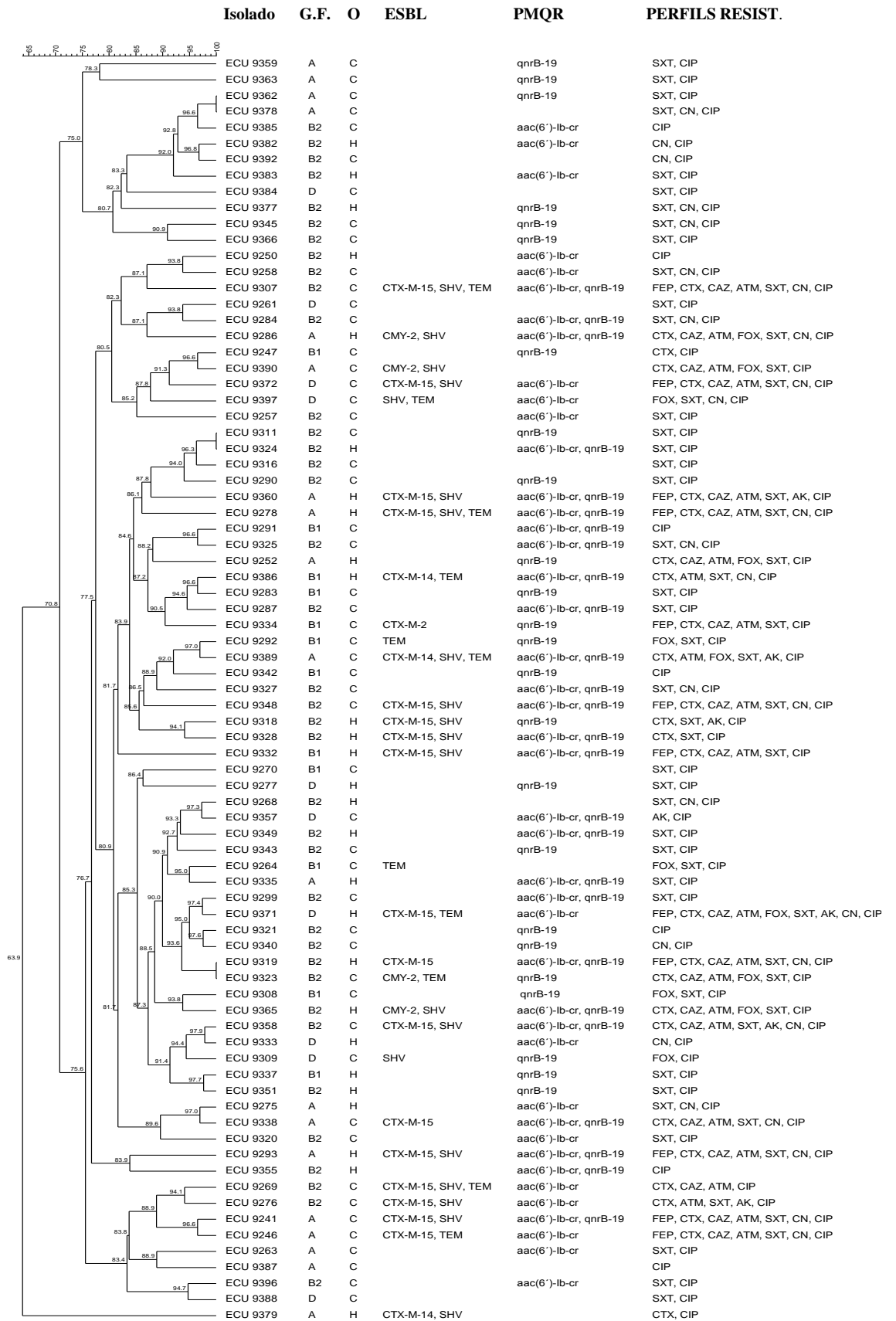


Figura 4.4 Dendrograma dos 79 isolados de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina. GF, grupo filogenético; O, Origem; H, hospital; C, comunidade; PMQR, Genes de Resistência Quinolonas Mediadas por Plasmídeos. **Fonte**, LAPIH

Além disso, o agrupamento das 35 amostras com produção fenotípica e genética de β -lactamases (**Figura 4.5**) revelou também um alto grau de polimorfismos, mais apresentam quatro clones predominantes. As cepas que pertencem aos mesmos grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) formam agrupamentos clonais muito próximos, similar aos isolados bacterianos de origem hospitalar e comunitária. Dois genótipos foram caracterizados com similaridade de 96,3%, sendo estas provenientes de um mesmo hospital (H3) e com um perfil de resistência similar. Outro dado importante neste grupo é observar que os genótipos produtores da enzima CTX-M-15 estão agrupados em três grandes clones, e um deles tem grau de similaridade de 85,2%, e são pertencentes ao grupo filogenético B2, do clone pandêmico ST131. Este clone também apresenta co-produção com outras β -lactamases como SHV e TEM e outros genes de resistência.

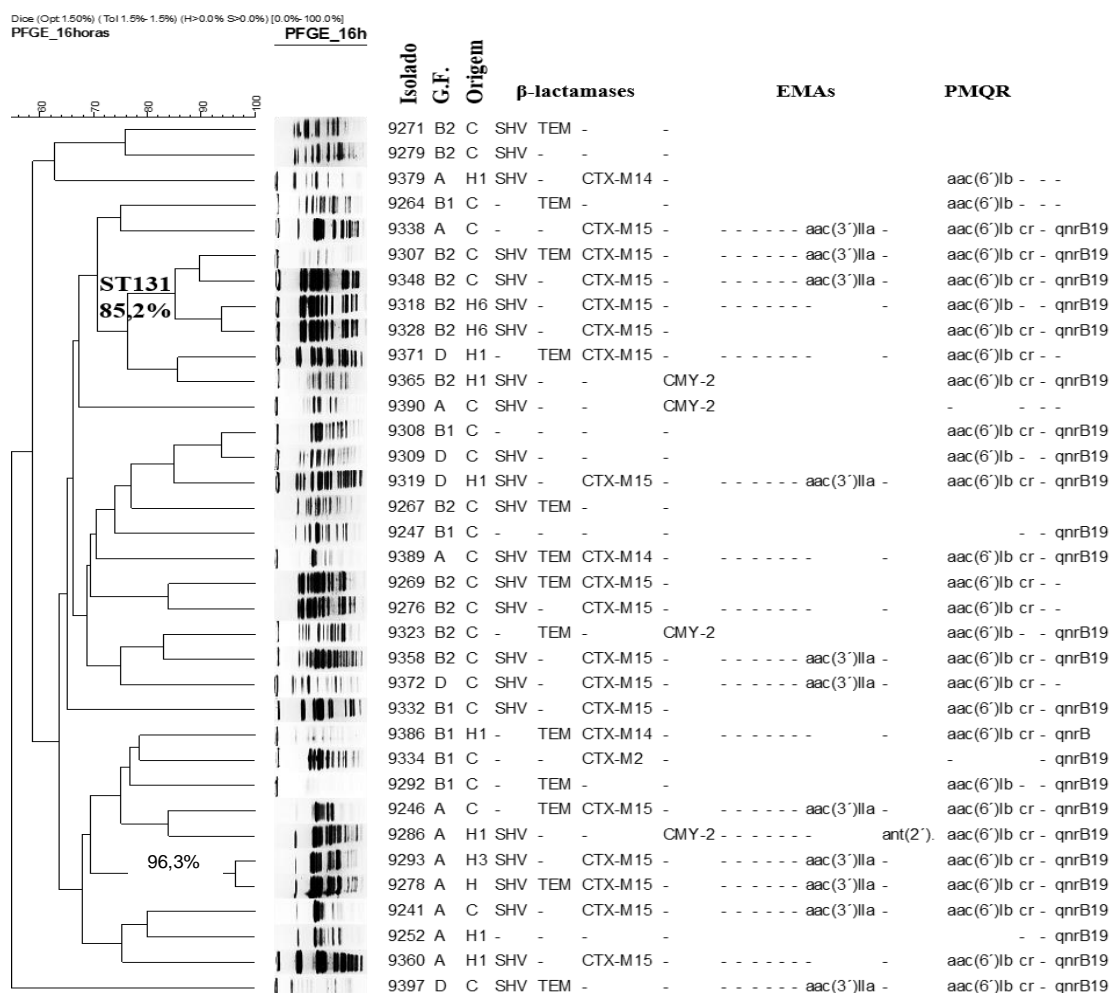


Figura 4.5 Dendrograma de *E.coli* uropatogênicas produtoras de β -lactamases H1, hospital Eugenio Espejo; H3, hospital Gonzalo Gonzáles; H6, hospital Militar; C, comunidade; GF, grupo filogenético; PMQR, Genes de Resistência a Quinolonas Mediadas por Plasmídeos. **Fonte**, LAPIH

4.6.3 Multilocus Sequence Typing – MLST

Os resultados de MLST obtidos pela Plataforma do Instituto Pasteur revelaram a predominância do ST43 pertencente ao CC43 (obtido por eBurst V3) nas 17 amostras positivas para o gene *bla*_{CTX-M-15}.

Outras sequências tipo-ST foram encontradas: o ST2 pertencente a CC2, ST160 pertencente ao CC2, ST365 do CC2, ST173 do CC2, ST21 do CC87, ST477 do CC44, ST472 do CC721 e ST38 pertencente ao CC38 (**Tabela 4.13**). Estes resultados demonstram a heterogenicidade clonal mostrada no PFGE, e a predominância dos clomplexos clonais 43 e 2 (**Figura 4.6**).

Tabela 4.13 Complexos clonais de *E. coli* por MLST do Instituto Pasteur.

Isolado	Perfil alélico								ST	Complexo Clonal
	<i>dinB</i>	<i>icdA</i>	<i>pabB</i>	<i>polB</i>	<i>putP</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uidA</i>		
9241	8	2	7	103	7	1	4	2	365	CC2
9246	8	2	7	64	7	1	4	2	160	CC2
9269	9	1	15	7	4	9	6	9	43	CC43
9276	9	1	15	7	4	9	6	9	43	CC43
9278	8	2	7	3	7	1	4	2	2	CC2
9293	8	2	7	3	7	1	4	2	2	CC2
9307	9	1	15	7	4	9	6	9	43	CC43
9318	9	1	15	7	4	9	6	9	43	CC43
9319	30	45	33	37	27	34	24	9	472	CC721
9328	9	1	15	7	4	9	6	9	43	CC43
9332	7	33	18	2	5	28	2	2	21	CC87
9338	10	29	7	3	7	1	60	2	173	CC2
9348	9	1	15	7	4	9	6	9	43	CC43
9358	32	65	4	10	5	8	2	5	323	ND
9360	13	39	11	15	2	25	8	19	38	CC38
9371	30	45	33	37	27	34	24	9	472	CC721
9372	17	9	28	12	9	135	9	11	477	CC44

ND, Não Determinado

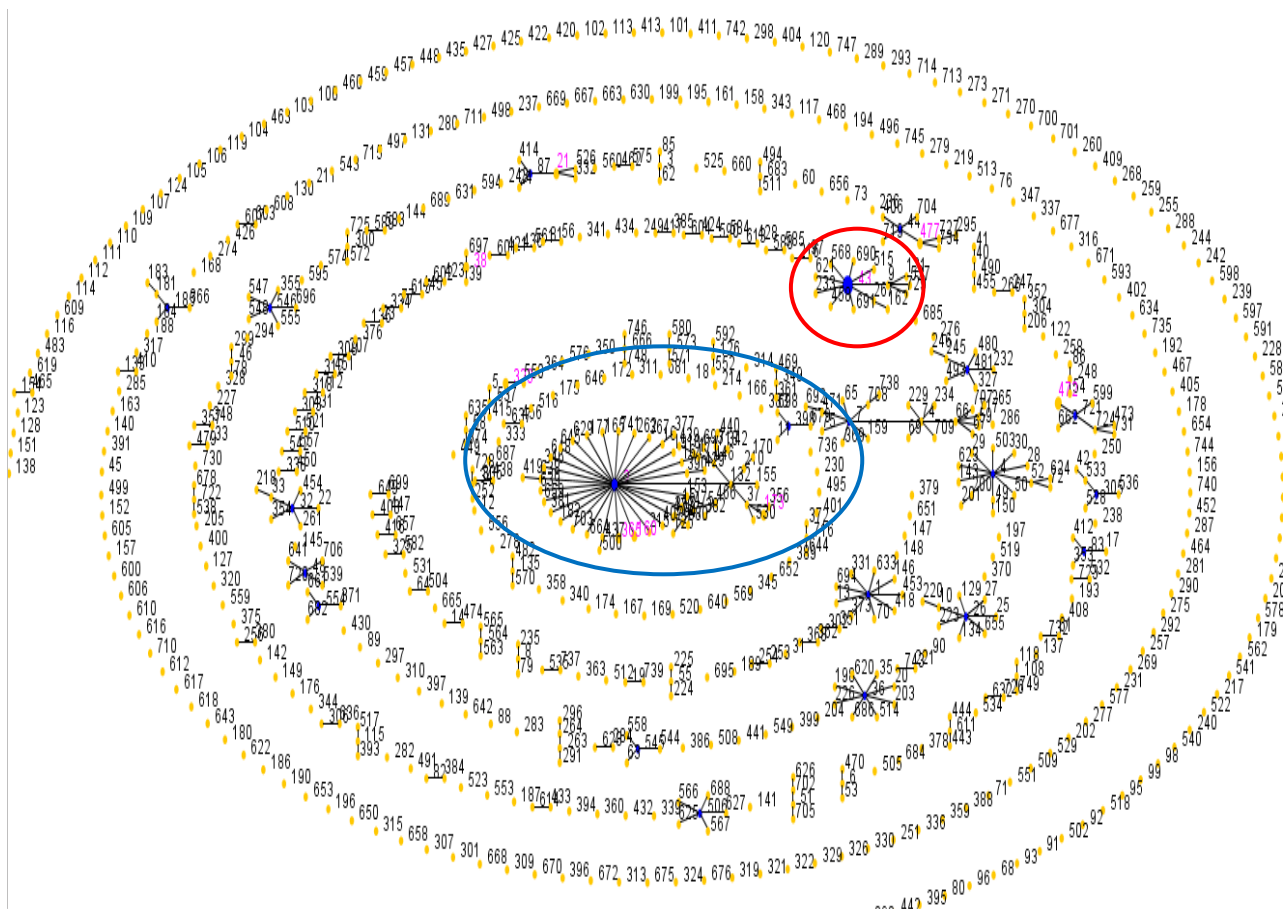


Figura 4.6 Diagrama dos STs descritos pelo Instituto Pasteur, por e-Burst V3

O CC2 obtido através da análise do Instituto Pasteur, foi o segundo grupo com destaque neste trabalho, apresentando quatro diferentes perfis alélicos com quatro sequence type (ST), mais pertencentes ao mesmo complexo clonal (**Tabela 4.14 e Figura 4.7**)

Tabela 4.14 Relação do complexo clonal CC2 – Instituto Pasteur

Cepa	Especie	Fonte	dinB	icdA	pabB	poIB	putP	trpA	trpB	uidA	ST	CC
9241	<i>E. coli</i> uropatogênica	urina	8	2	7	103	7	1	4	2	365	CC2
9246	<i>E. coli</i> uropatogênica	urina	8	2	7	64	7	1	4	2	160	CC2
9278	<i>E. coli</i> uropatogênica	urina	8	2	7	3	7	1	4	2	2	CC2
9293	<i>E. coli</i> uropatogênica	urina	8	2	7	3	7	1	4	2	2	CC2
9338	<i>E. coli</i> uropatogênica	urina	10	29	7	3	7	1	60	2	173	CC2

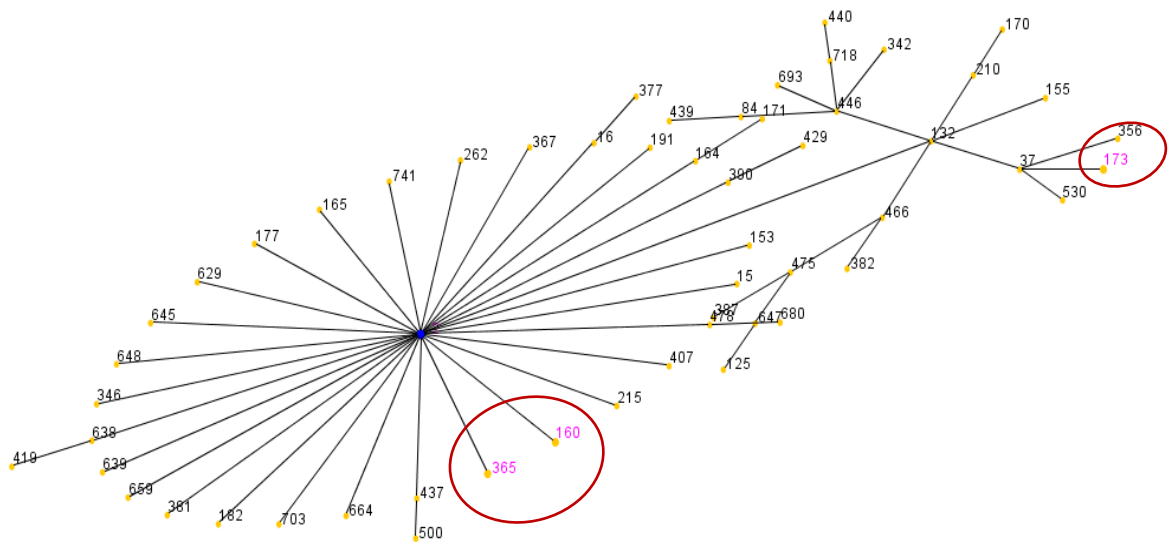


Figura 4.7 Complexo Clonal 2 (CC2) obtido pelo Instituto Pasteur

4.6.3.1 Clone ST-131-B2 *E. coli* produtor de CTX-M-15

Todas as seis amostras tipificadas como ST43 foram confirmadas como o clone ST131-B2 de *E. coli* pelo Esquema de Atchman, realizado no Laboratório de Genética Molecular Bacteriana da Universidade El Bosque, na cidade de Bogotá, Colômbia. Depois da identificação do clone ST131, procedeu-se a agrupação dos determinantes genéticos de resistência antibiótica que contêm nestes isolados bacterianos (**Figura 4.8**), o que determina seu alto grau de resistência antibiótica. Observa-se, a presença da ESBL tipo SHV em todos os isolados e o gene *aac(6')*-*lb-cr* em cinco amostras.

É importante descrever o perfil alélico dos dois Esquemas utilizados neste trabalho, do Instituto Pasteur e de Atchman, segundo os genes *housekeeping* utilizados nas duas plataformas (**Tabela 4.15**)

Tabela 4.15 Perfil alélico dos Esquemas do MLST

ST-43 Instituto Pasteur								ST-131 Achtman							
<i>dinB</i>	<i>icdA</i>	<i>pabB</i>	<i>polB</i>	<i>putP</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uida</i>	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
2	65	3	10	26	7	4	57	53	40	47	13	36	28	29	

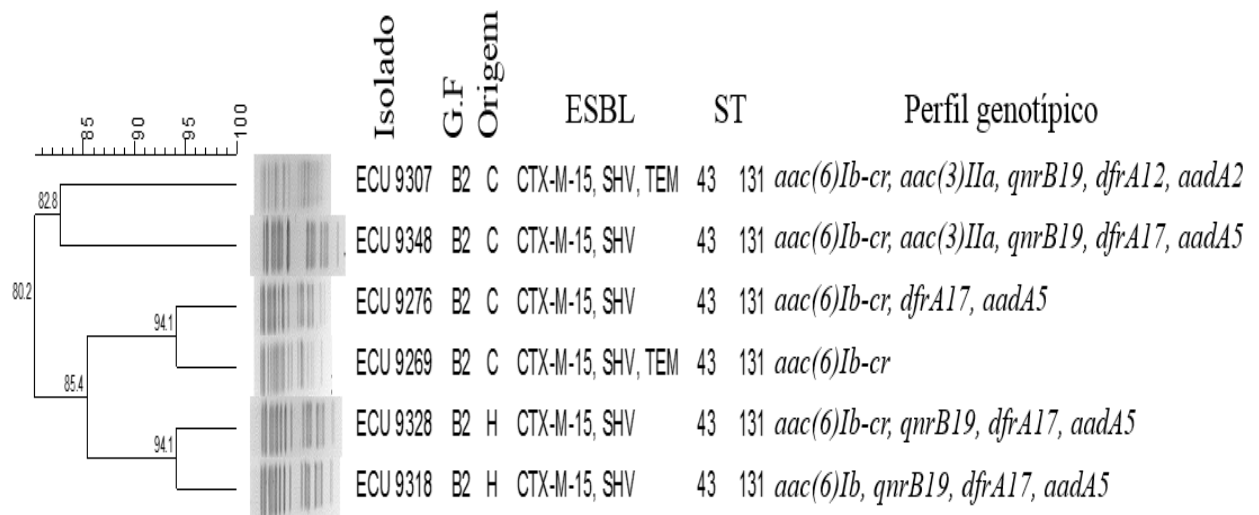


Figura 4.8 Determinantes genéticos de resistência do clone ST131 de *E. coli* de origem urinária

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado em 156 amostras de origem urinária provenientes da comunidade (120 amostras) e do hospital (36 amostras) e coletadas na cidade de Quito, Equador. Segundo WEICHHART et al. (2008) e FOSTER (2008), aproximadamente 150 milhões de casos de infecção do trato urinário (ITU) ocorrem anualmente em todo o mundo. Nos Estados Unidos as ITUs ocasionam gastos de mais de 6 milhões de dólares anuais. Isto faz entender o enorme impacto que têm as ITUs em termos de morbidade e custo econômico. A ITU está entre as doenças infecciosas mais frequentes na prática clínica, afetando principalmente o sexo feminino, especialmente na mulher jovem sexualmente ativa (HOOTON et al. 2004). Quanto ao agente etiológico, *Escherichia coli* é o principal agente causador das infecções do trato urinário, causando 85–90% das ITUs comunitária e 50% das ITUs hospitalares (NICOLLE et al. 2006).

O presente trabalho consistiu na análise de 156 amostras de *E. coli* recuperadas de pacientes com ITU. As amostras foram classificadas de acordo com origem, observando 76,92% (120/156) de origem comunitária e 23,1% (36/156) de origem hospitalar. Na distribuição dos casos de ITU por gênero e idade, 87,8% (137/156) pertencem a pacientes do sexo feminino, sendo apenas 12,2% (19/156) do sexo masculino. Considerando a faixas etárias, as idades entre os 15 até 49 anos foi a mais comprometida, com 50% (78/156) principalmente no sexo feminino. Estes primeiros resultados estão em concordância com estudos anteriores, em relação à origem, gênero e idade (FOSTER 2008, HOOTON et al. 2004). É importante salientar que mulheres acima dos 50 anos de idade também apresentaram altos percentuais de ITU, o que poderia refletir na predisposição e os fatores de risco nesta faixa etária, principalmente esvaziamento ineficaz da bexiga por prolapso uterino, má higiene e alterações hormonais da menopausa (NICOLLE 2001). Nos homens, a faixa etária mais comprometida foi acima dos 50 anos, o que poderia estar relacionado com perda da funcionalidade do aparelho urinário principalmente devido à hipertrofia da próstata. É importante indicar que em nosso estudo não foi possível obter todos os dados dos pacientes, razão pela qual não se conhece a doença de base de cada um deles.

Em relação ao tratamento das ITU, o primeiro antibiótico utilizado na era moderna foi a sulfanilamida, no ano de 1937, seguido da nitrofurantoína no ano

1953, mais tarde substituída por trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) e pelos antibióticos β -lactâmicos. O último grupo de antibióticos utilizados na terapêutica das ITUs são as fluoroquinolonas, que chegaram no final da década de 80 (FOSTER, 2008). Vale ressaltar que o conhecimento do agente causador e do seu perfil de resistência é indispensável para a escolha dos antibióticos na terapêutica empírica das ITUs e não deve ser incluído nesta terapêutica aqueles antimicrobianos que apresentam taxas de resistência acima de 20% (COSTELLOE et al. 2010; GUPTA et al. 2011, MOYA-DIONISIO et al. 2016).

No ano 1999, a Sociedade Americana de Infectologia (IDSA) recomendou o uso de trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) como antibiótico de primeira escolha para o tratamento empírico de infecção urinária não complicada, com apenas três dias de tratamento (WARREN et al. 1999). No entanto, nos últimos anos, tem sido documentado a alta prevalência de resistência da *E. coli* a SXT, o que levou ao questionamento sobre o uso desta droga como primeira escolha no tratamento empírico destes pacientes. Atualmente, e segundo Gupta et al. (2011) o uso de SXT deve ser aplicado apenas quando a resistência não seja superior a 20%, e não recomenda-se usar amoxicilina ou ampicilina pelos altos níveis de resistência que as mesmas apresentam. No tratamento das ITUs não complicadas da comunidade e as ITUs complicadas como a pielonefrite que não necessita de hospitalização, podem ser utilizadas as fluoroquinolonas (ciprofloxacina ou norfloxacina), por apresentarem boa atividade bactericida contra patógenos Gram-negativos. Nos casos de apresentar resistência às fluoroquinolonas, recomenda-se utilizar fosfomicina 3gr dose única, ou Nitrofurantoina 100mg cada 12 horas durante cinco dias. É importante salientar o uso dos carbapenêmicos nos casos de sepse urinária (GUPTA et al. 2011)

O presente trabalho basea-se no tratamento empírico utilizado nas ITU, no qual avaliamos o perfil de resistência de *E. coli* do trato urinário para vários antibióticos, obtendo-se alta resistência em isolados obtidos na comunidade e maior nas amostras de origem hospitalar. De acordo com os resultados encontrados, o SXT, ciprofloxacina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, ampicilina e a gentamicina, apresentaram resistência maior de 20%, portanto e segundo as recomendações de Gupta et al (2011) estes antibióticos não podem ser utilizados no tratamento empírico das infecções urinárias.

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e SXT tem evoluído ao longo do tempo em vários lugares no mundo. Antes de 1990 a resistência a SXT foi de 0,5- 5% (HOOTON et al. 2004). Nos Estados Unidos, em 454 amostras de *E. coli* uropatogênicas coletadas entre 1989–1997 foi observado aumento da resistência de 7 a 18% para SXT, 29 - 35% para ampicilina, 11 - 7% para cefalotina, e ausência de resistência às fluoroquinolonas (GUPTA et al. 1999). KARLOWSKY et al. (2002) ao estudarem 286.187 amostras coletadas nos Estados Unidos de 1995 a 2001, reportaram aumento na resistência à SXT de 14,8% em 1995 para 16,1% em 2001, à ciprofloxacina de 0,7% em 1995 para 2,5% em 2001, ampicilina de 36% em 1995 para 37% em 2001. KAHLMETER (2003) realizou o primeiro estudo internacional de vigilância da resistência aos antimicrobianos usados no tratamento das ITU (Projeto ECO-SENS), abrangendo 17 países de Europa e Canadá, com 4.734 amostras. O mesmo encontrou resistência à SXT de 4,9% - 21% na maioria dos países europeus, à ciprofloxacina variando entre 0% - 14%, à gentamicina de 0% - 4,7%, à AMC de 0 – 9,3%, e à ampicilina entre 15,5 – 53,9%, considerando todos os países do estudo. SANCHEZ et al. (2008) com 38.676 amostras de *E. coli* coletadas da comunidade nos anos de 2002 a 2007 na Espanha, reportaram aumento na resistência a SXT de 28,5% em 2002 a 32,4% em 2007; ciprofloxacina com 22,9% em 2002 a 32,5% em 2007; AMC de 6,9% em 2002 a 20,6% em 2007 e ampicilina de 56% em 2002 a 62,6% em 2007.

Um estudo de resistência na América Latina, realizado por ANDRADE et al. (2006) como parte do SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program, Latin America), reportou taxas de 40,4% de resistência a SXT, 21,6% para ciprofloxacina, 8,4% para gentamicina, 53,6% para ampicilina, 1,2% para AMC, 1,2% para cefoxitina 1,5% para ceftazidima, 1% para cefepima e 1,7% para aztreonam. O mesmo estudo SENTRY (GALES et al. 2012), a partir de 5.704 amostras de *E. coli*, encontrou resistência para aztreonam (18,2%), cefepima (12,2%), cefotaxima (23,9%), cefoxitina (6,3%), ceftazidima (9,0%), ciprofloxacina (40,2%), gentamicina (17,5%), ampicilina (0,5%).

No Equador, estudos de resistência aos antibióticos foram feitos pela REDNARBEC, nos anos 1999 e 2007 respectivamente (SALLES et al. 2013), destacando o aumento de resistência às drogas de primeira escolha no tratamento das ITUs, principalmente ampicilina (72%), cefalotina (29%), SXT (57%), ciprofloxacina (41%), e gentamicina (18%) no ano 2007. Neste estudo foi observado

resistência menor que 3% para antibióticos β -lactâmicos de espectro estendido. No ano de 2014, outro programa de vigilância de resistência antimicrobiana foi iniciado pelo Ministério da Saúde do Equador, o Programa Red RAM, o qual reportou resistência para SXT (61% na comunidade e 71% no hospital), ciprofloxacina (53% comunidade e 61% no hospital), gentamicina (26% na comunidade e 40% no hospital) e, para os antibióticos β -lactâmicos de espectro estendido como a cefotaxima reportou resistência 38% na comunidade e 51% no hospital. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os relatos do Programa Red RAM de Equador, nas porcentagens de resistência que apresentam na comunidade e nos hospitais, e refletem a multirresistência antibiótica em *E. coli* uropatogênica e as poucas opções terapêuticas para tratamento nestes pacientes.

Estas porcentagens de resistência encontradas neste trabalho concordam com os estudos realizados na América Latina e no Equador. É importante realçar que as cepas de *E. coli* uropatogênicas do presente estudo apresentaram sensibilidade de 100% para o carbapenêmico testado (ertapenem) e 94% para a amicacina, similares ao reportado por SOLORZANO et al (2014) a partir de 31.758 amostras na Espanha, e aos estudos SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program, Latin America) no ano 2007 e 2013. Com estes resultados, é recomendável testar outros grupos de antibióticos e conhecer o seu perfil de sensibilidade, para saber qual antibiótico é o mais apropriado para o início da terapêutica empírica nas ITU. Uma possível explicação para esta grande taxa de resistência no Equador, é devido à livre venda de todos os antimicrobianos. Além disso, o Ministério de Saúde fornece medicamentos básicos às unidades de saúde comunitárias e hospitalares de todo o país, entre os quais se encontram principalmente SXT, amoxicilina, cefalexina, amoxicilina/ácido clavulânico e ciprofloxacina, todos estes apresentando as maiores porcentagens de resistência fenotípica neste trabalho. Este uso inadequado em doses inadequadas de antimicrobianos pode ter levado a uma pressão seletiva e o aparecimento de resistência em *E. coli* uropatogênica e em outras espécies bacterianas (MARTINEZ-MARTINEZ, 2006).

Em relação à detecção fenotípica de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), das 156 amostras de *E. coli* de origem urinária, 22,4% (35/156) apresentaram produção fenotípica ESBL. A prevalência de ESBL neste trabalho é menor ao descrito anteriormente na América Latina que apresenta 26,8% de produção de ESBL (Villegas et al. 2011). Observou-se que a distribuição das ESBL

na comunidade foi de 18,3% (22/120) e no hospital foi de 36,1% (13/36). Equador dispõe de pouca informação quanto à produção fenotípica e genética de ESBL em *E. coli*. Deste modo. MATTAR & MARTINEZ (2007) reportaram a presença de 27% de produção de ESBL tipo SHV em cepas de *E. coli*, e NORDBERG (2013) em 160 amostras de enterobactérias (*E. coli* e *K. pneumoniae*) provenientes de um hospital de terceiro nível da área de neonatologia, reportou 56% das amostras com resultado fenotípico positivo para ESBL em *E. coli*, maior que o encontrado neste trabalho.

Considerando a origem das amostras, a prevalência das ESBL na comunidade foi de 18,3%, maior que os dados encontrados no Brasil por MINARINI (2007) (1,5%), WOLLHEIM (2011) (0,5%), ABREU (2013) (7,6%) e GONÇALVES (2016) (7,1%); salientando que no Equador não temos dados de produção de ESBL na comunidade, o que demonstra a importância destes resultados. Temos que destacar que os níveis de resistência das cepas produtoras de ESBL foram altos (acima de 20%), principalmente para SXT, ciprofloxacina e gentamicina, com exceção de amicacina e ertapenem, revelando que os amiglicosídeos e carbapenêmicos devem ser considerados na terapêutica das ITUs em cepas produtoras de ESBL, segundo recomendações de CHO et al. (2016). Outras opções de tratamento para cepas produtoras de ESBL são os antibióticos fosfomicina ou tigeciclina (CASELLAS 2011).

Quanto aos tipos de ESBL, nosso trabalho reportou 68,6% (24/35) para *bla*_{SHV}; 60% (21/35) para *bla*_{CTX-M}; 37,1% (13/35) para *bla*_{TEM}; e 11,4% (4/35) para *bla*_{AmpC}, com maior presença do SHV e CTX-M, o que foi similar aos estudos que demonstraram que estas duas ESBL são as mais frequentes na América do Sul (MATTAR & MARTINEZ 2007, VILLEGAS et al. 2008). Pela importância epidemiológica foi sequenciado o gene *bla*_{CTX-M}. Os resultados revelaram a predominância da variante CTX-M-15 com 80,9% (17/21), CTX-M-14 e CTX-M-2 foram também descritas neste trabalho. Estes resultados concordam com outros estudos que demonstram a maior prevalência da enzima CTX-M, relacionado principalmente com *E. coli* causadoras de infecções urinárias na comunidade, pelo que é conhecida como CTX-M pandêmica (PEIRANO & PITOUT 2010, CHONG et al. 2011). O sequenciamento de *bla*_{AmpC} revelou que todos os isolados pertencem à variante CMY-2, o qual é a mais prevalente em alguns lugares do mundo e América (JURE et al. 2011, PITOUT 2012). Estas duas β-lactamases, CTX-M e CMY-2, são

as responsáveis pela resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos de espectro estendido (JACOBY, 2009; PITOUT J, 2012).

A enzima CTX-M, chamada de pandêmica, foi descrita nos anos 90. Nas Américas tem sido descrita na quase totalidade na América do Sul (BONELLI et al. 2014), com predominância da enzima CTX-M-15 e CTX-M-2 em países como Peru e Bolívia (PALLECCHI et al. 2004), Colômbia (PULIDO et al. 2011, BLANCO et al. 2016), Venezuela (MILLÁN et al. 2014), Argentina (SENNATI et al. 2012), Uruguai (BADO et al. 2016) e Brasil (CERGOLE-NOVELLA et al. 2010, PEIRANO et al. 2011, DA SILVA 2012, BONELLI et al. 2014), junto com a enzima CTX-M-14 que também foi descrita no Peru, Argentina e Brasil. Os resultados do presente trabalho, estão de acordo com as descrições das ESBL tipo CTX-M nos países de América do Sul. Estas ESBLs têm sido descritas em vários ambientes como nos animais domésticos e selvagens, alimentos, esgotos e vegetais comestíveis (ZURFLUH et al. 2015, PLATELL et al. 2011, LAHLAOUI et al. 2014).

Recentemente, *E. coli* produtora de CTX-M-15 disseminou-se mundialmente, relacionada com multiresistência e, principalmente, ao clone ST131 pertencente ao grupo filogenético B2 de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC), altamente virulento e produtor desta enzima (CHONG et al. 2011). Este clone ST131-B2 de *E. coli* produtor da enzima CTX-M-15 foi descrito simultaneamente em vários lugares do mundo no ano 2008 (France, Portugal, Spain, Switzerland, Lebanon, India, South Korea, and Canada) (NICOLAS-CHANOINE et al. 2008, SCHEMBRI et al. 2015). Este clone ST131 é responsável por elevada proporção de infecções sanguíneas e do trato urinário nos ambientes comunitários e hospitalares (PITOUT 2012; PETTY et al. 2014). Além disso, sabe-se que este clone leva vários determinantes de resistência plasmídicos como os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *aac*(6')-Ib-cr, *aac*(3')-IIa e os genes *qnr* (PEIRANO & PITOUT 2010, NOVAIS et al. 2012), o que conferem resistência para vários grupos de antibióticos, principalmente os β -lactâmicos de espectro estendido, quinolonas e aminoglicosídeos (PETTY et al. 2014). Esta multirresistência faz com que as infecções causadas por *E. coli* do clone ST131-B2 tenham poucas opções terapêuticas sendo considerado um grande problema de saúde pública (STOESSER et al. 2016). Neste estudo, 35,2% (6/17) das amostras CTX-M-15 foram positivas para este clone *E. coli* ST131-B2, com resistência para todos os antibióticos testados, de acordo com a bibliografia descrita.

Na transferência horizontal de resistência, os elementos móveis e principalmente os integrons, em sua maioria de classe 1, tem uma função fundamental de capturar eficientemente e expressar genes cassette exógenos (COLLIS & HALL 1995). Nosso trabalho reportou a presença do integron de classe 1 em 63,4% (64/101) das amostras, mas apenas 31,7%(32/101) apresentaram genes na amplificação da região variável do integron, principalmente genes de tipo *drfA* e *aadA* com as suas variantes, que vão dar resistência a trimetoprim, estreptomicina e espectinomicina (SANDVANG 1999). Neste estudo não foi encontrado no integron os genes *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *aac(3')-IIa* e *qnr*, possivelmente devido à posição destes genes fora da região variável do integron. Os integrons de classe 1 têm sido descritos em várias espécies bacterianas no Brasil, Bolívia, Chile, Costa Rica, Peru, Uruguai (BARRANTES & ACHÍ 2016), Argentina (MARCHISIO et al. 2015) e Colômbia (O'MAHONY et al, 2006).

Com relação aos determinantes genéticos de resistência às fluoroquinolonas, os genes de transferência plasmidial que estão envolvidos na resistência a estes antibióticos são principalmente *aac(6')-Ib-cr* e *qnr*, reportados por nosso trabalho nas proporções de 54,4% (43/79) e 60,8% (58/79) respectivamente, com predomínio nas amostras de origem hospitalar nos dois genes. Estes genes são descritos ao redor do mundo, conjuntamente com β -lactamases e com perfis de resistência a múltiplos antibióticos (PEIRANO & PITOUT 2010, CHONG et al. 2011, PITOUT 2012). Na América Latina, o gene *aac(6')-Ib-cr* tem sido descrito na Argentina, Bolívia, Brasil, México, Peru (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2011, ANDRES et al. 2013, JACOBY et al. 2014), Uruguai (BADO et al. 2016) e Chile (ELGORRIAGA-ISLAS et al, 2012). Em relação ao gene *qnr* apresenta cinco variantes, entretanto, no presente estudo detectou apenas a variante *qnrB19*, que tem sido descrita na América, principalmente na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, México, Peru e Venezuela (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2011, ANDRES et al. 2013, JACOBY et al. 2014). Esta prevalência absoluta do gene *qnrB19* em nossas amostras é similar aos estudos realizados por PALLECCHI et al (2010) em amostras comunitárias de Peru e Bolívia e por CATTOIR et al (2008) na Colômbia. Isto sugere a prevalência deste gene nesta região das Américas (Colômbia, Ecuador e Perú).

No Equador, ARMAS-FREIRE et al (2015) reportaram a presença do gene *qnrB* em isolados de *E. coli* intestinal, sem especificar o alelo, em amostras de diferentes origens (humano e aves de criação na comunidade), destacando que nas

amostras humanas da comunidade, a presença do gene *qnrB* foi de 31% (11/35). Estes resultados, não estão de acordo com os achados em nosso estudo em relação ao gene *qnrB*, onde foi encontrada a porcentagem de 24,2% (29/120) nas amostras de origem comunitária, o qual representa uma porcentagem menor.

Na resistência aos antibióticos aminoglicosídeos, os principais mecanismos de resistência são as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (RAMIREZ & TOLMASKY 2010), e os genes 16S rRNA (DOI & ARAKAWA 2007, FRITSCHE et al. 2008). No presente estudo não foram detectados os genes 16S rRNA, embora tenham sido descritos na Ásia (YANG et al. 2011, TSUKAMOTO et al. 2013), Europa, Norte América e América Latina (FRITSCHE et al. 2008) e no Brasil (BUENO et al. 2013). Com relação as EMAs, encontramos predominância dos genes *aac(6')-Ib* com 74,3% (29/39) e *aac(3')-IIa* com 71,1% (28/39), principalmente, no ambiente hospitalar. O gene *aac(6')-Ib*, o gene EMA mais prevalente, confere resistência à amicacina, tobramicina e kanamicina (KIM et al. 2011). Neste trabalho foi encontrado o gene *aac(6')-Ib* nos 09 isolados com resistência fenotípica à amicacina, mas também em 20 isolados que apresentaram sensibilidade à amicacina, evidenciando que a presença de um determinante genético de resistência não garante a expressão da resistência fenotípica. O gene *aac(3')-IIa*, que confere resistência à gentamicina, foi encontrado em 28/35 isolados com resistência fenotípica à gentamicina, o que sugere que outros mecanismos de resistência estão atuando nas sete amostras que também apresentaram resistência à gentamicina. Estes dois genes *aac(6')-Ib* e *aac(3')-IIa* são os genes EMAs mais comuns (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al. 2015), e frequentemente estão associados à outros determinantes de resistência antibiótica dentro de um mesmo elemento móvel (WOODFORD et al, 2009; CARATTOLI, 2009; PEIRANO PITOUT, 2010). No Equador, não temos dados publicados destes genes EMAs, o que demonstra a importância deste estudo.

Nos grupos filogenéticos, foi predominante o grupo B2 chamado de patogênico (CLERMONT et al. 2000), o qual contém a maioria dos determinantes genéticos de resistência pesquisados. Destaca-se que os genes de resistência pesquisados estão distribuídos nos quatro grupos filogenéticos, incluídos nos chamados não patogênicos (grupos filogenéticos A e B1). Isto demonstra a transferência horizontal de material genético entre as cepas bacterianas através dos elementos móveis, relacionado com genes de virulência, resistência e funções do

metabolismo bacteriano, contribuindo para a evolução e adaptação do microrganismo ao meio ambiente (MULVEY & SIMOR 2009)

Na análise genética, o PFGE evidencia diferentes perfis, o que revela um alto grau de polimorfismos entre os isolados que não têm relação epidemiológica e que têm diferente origem, comunitário e hospitalar. Mais, se observam clones que estão agrupados principalmente segundo a sua origem e pelos grupos filogenéticos nos três agrupamentos de resistência antibiótica. O clone ST131 está presente em dois perfis. O primeiro está agrupado com 85,4% (4 isolados) de similaridade e o outro com 82,8% de similaridade. Esta diferença nas porcentagens dos perfis de similaridade no clone ST131 é descrito em vários estudos, com porcentagens de similaridade $\geq 65\%$ (WOODFORD et al. 2009, PEIRANO & PITOUT 2010, PETTY et al. 2014).

O MLST permitiu caracterizar e observar as relações filogenéticas entre as cepas de *E. coli*, agrupando-as em diferentes ST, com predominância do ST131 obtido pelo Esquema de Achtman. Entretanto, outros STs foram encontrados: ST-2 e ST-472 descritos nos Estados Unidos (SUWANTARAT et al, 2014), ST160 descrito na China (DENG et al, 2011), ST365 descrito no Canadá (PEIRANO et al, 2014), ST21 descrito na Polônia (JANUSZKIEWICZ et al, 2015), ST38 descrito na Alemanha (GERHOLD et al, 2016).

Atualmente, o clone ST131 de *E. coli* produtora de CTX-M-15 tem se espalhado nos ambientes comunitárias e hospitalares, relacionado principalmente a infecções do trato urinário e bacteremias (NICOLAS-CHANOINE et al. 2014, SCHEMBRI et al. 2015), similar ao encontrado neste estudo, onde quatro amostras foram de origem comunitária e dois de origem hospitalar. Na América Latina, o clone ST131 tem sido descrito no México (MOLINA-LÓPEZ et al. 2011), Brasil (PEIRANO et al. 2011), Colômbia (RUIZ et al. 2011) e Argentina (SENNATI et al. 2012).

O presente estudo demonstra que a resistência em cepas de *E. coli* uropatogênicas se encontra disseminada nos ambientes comunitários e hospitalares, com predomínio nos hospitais, confirmado com a presença dos determinantes genéticos de resistência aos três principais grupos de antibióticos usados no tratamento empírico das ITUs. Igualmente, confirma a presença do clone pandêmico ST131 de *E. coli* produtora da enzima CTX-M-15 nos dois ambientes, o que demonstra a importância deste estudo com as amostras do Equador.

6 CONCLUSÕES

- Entre os 156 isolados de *E. coli* foram observadas porcentagens de resistência superiores a 20% para 6 dos 13 antimicrobianos testados, destacando que 100% das cepas foram suscetíveis para ertapenem. A resistência foi maior nas amostras de origem hospitalar.
- Isolados clínicos de *Escherichia coli* produtores de ESBL carregavam os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{AMPC}, com predominância de *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M-15}.
- Isolados clínicos resistentes à ciprofloxacina carregavam os genes *qnr* e *aac(6')-Ib-cr*, destacando a predominância do 100% para o gene *qnrB* alelo 19 (*qnrB19*).
- Foram detectados os genes *aac(6')-Ib*, *aac(3')-IIa* nos isolados de *E. coli* com resistência à amicacina e gentamicina, com maior porcentagem nas amostras de origem hospitalar.
- Foram encontrados os integrons de classe 1, os quais carregavam principalmente genes *drfA* e *aadA*.
- Os grupos filogenéticos B2 e A foram encontrados com maior frequência entre os isolados clínicos de *E. coli* uropatogênica. Os genes de resistência pesquisados estão distribuídos nos quatro grupos filogenéticos, incluídos nos grupos chamados de não patogênicos (grupos filogenéticos A e B1).
- A análise por PFGE demonstrou alto grau de polimorfismo entre os 101 isolados clínicos de *E. coli* com resistência.
- Na análise pelo MLST, os 17 isolados CTX-M-15 positivos foram caracterizados entre nove STs (ST2, ST472, ST160, ST365, ST173, ST21, ST477, ST38 e ST131-B2) de *E. coli*, os quais foram agrupados em 6 complexos clonais.
- Foi identificado o clone pandêmico ST131-B2 de *Escherichia coli* produtor da enzima CTX-M-15, espalhado nos ambientes comunitários e hospitalares.

- Finalmente, podemos dizer que as informações geradas neste trabalho, trazem novos conhecimentos sobre a ocorrência das ESBL, AmpC, PMQR, EMAs e clones de resistência (ST131-B2-*E. coli*) no Equador, o qual ainda não são estudados completamente.

7 PERSPECTIVAS

- Na atualidade, o Equador não possui muita informação relacionada à resistência antibiótica molecular, desconhecendo as causas genéticas que levam aos fracassos nos tratamentos clínicos de algumas doenças infecciosas nos hospitais e na comunidade. Este conhecimento genético de resistência bacteriana vai auxiliar no melhor controle e vigilância epidemiológica, o que vai levar a melhorar na escolha dos antibióticos no momento do início do tratamento.
- Por isto, vamos continuar com o monitoramento dos perfis de resistência antibiótica em cepas bacterianas de interesse em saúde pública no Equador, com apoio da Red-RAM, para conhecer melhor os perfis de resistência antibiótica. Desta forma, a escolha do medicamento vai ser a apropriada na terapêutica das doenças infecciosas, especialmente nos tratamentos empíricos.
- Com o conhecimento dos perfis de resistência, nós vamos procurar alternativas de tratamento antibiótico mais específicos nas infecções bacterianas, principalmente na presença de clones com multirresistência.
- Continuar com pesquisas relacionadas com a resistência antibiótica nas bactérias de interesse na saúde pública; aplicando os procedimentos moleculares aprendidos durante a elaboração deste projeto.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu AG, Marques SG, Monteiro-Neto V, Gonçalves AG. Extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae in community-acquired urinary tract infections in São Luís, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2013;30;44(2):469-71.

Adib N, Ghanbarpour R, Solatzadeh H, Alizade H. Antibiotic resistance profile and virulence genes of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in relation to phylogeny. *Trop Biomed.* 2014;31(1):17-25.

Alamo-Solis C. Infección del Tracto Urinario en Niños. *Paediátrica.* 2000;3(1):14-21.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289(1036):321-31.

Andrade SS, Sader HS, Jones RN, Pereira AS, Pignataria CC, Gales AC. 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, Rio de Janeiro.* 2006;101(7):741-748.

Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, *et al.* Differential Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria with Unusual Phenotypes of Quinolone Susceptibility from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2467-75.

Armas-Freire PI, Trueba G, Proaño-Bolaños C, Levy K, Zhang L, Marrs CF, *et al.* Unexpected distribution of *qnrB* gene in *E. coli* isolates from different origins in Ecuador. *Int Microbial.* 2015;18(2):85-90.

Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, *et al.* CTX-M-15 in combination with *aac(6')-Ib-cr* is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016;6:5-9.

Barrantes K, Achí R. The importance of integrons for development and propagation of resistance in *Shigella*: the case of Latin America. *Braz J Microbiol.* 2016;47(4):800-806.

- Barraud O, Ploy MC. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *J. Bacteriol.* 2015;197(13):2171-8
- Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley R, Jungwirth P, Mangold T, *et al.* A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection.* 1992;20(3):158-63.
- Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1:S347-57.
- Biassoni L, Chippington S. Imaging in Urinary Tract Infections: Current Strategies and New Trends. *Semin Nucl Med.* 2008;38:56-66.
- Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50(1):59-69.
- Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *International Journal of Nephrology.* 2012;2012:1-15.
- Blanco VM, Maya JJ, Correa A, Perenguez M, Muñoz JS, Motoa G, *et al.* Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-onset urinary tract infections in Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(9):559-565.
- Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resist Updat.* 2014;17(1-2):24-36.
- Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004;48(1):1-14.
- Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001;14(4):933–951.

- Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*. 1987;2(8554):302–306.
- Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA Methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M Group Extended-Spectrum β Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2397-400.
- Bush K, Fisher JF. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*. 2011;65:455–78.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-33.
- Bush K, Jacoby GA. Update functional classification of Beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
- Caetano-Anolles G, Greshoff PM. DNA markers: protocols, applications and overviews. Editora J. Wiley and Sons, New York, N.Y. 1997:151-171.
- Carattoli A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(6):2227–2238.
- Casellas JM. Resistência a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):519–28.
- Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;60(2):394-7.
- Cattoir V, Nordmann P, Silva-Sanchez J, Espinal P, Poirel L. ISEcp1-Mediated Transposition of *qnrB*-Like Gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2929-32.

Cergole-Novella MC, Guth BE, Castanheira M, Carmo MS, Pignatari AC. First description of *bla*(CTX-M-14)- and *bla*(CTX-M-15)-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2010;16(3):177-84.

Chang S, Shortliffe LD. Pediatric Urinary Tract Infections. *Pediatr Clin N Am*. 2006; 53:379– 400

Cho SY, Choi SM, Park SH, Lee DG, Choi JH, Yoo JH. Amikacin therapy for urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Korean J Intern Med*. 2016;31(1):156-61.

Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011;11(7):1499-504.

Chung A, Arianayagam M, Rashid P. Bacterial cystitis in Women. *Australian Family Physician*. 2010;39(5):295-298.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(10):4555–4558.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100–S21*. CLSI, Wayne, PA, USA. 2013.

Collis CM, Hall RM. Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(1):155-62.

Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010;340:c2096.

Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(1):26-38.

Da Silva KC, Lincopan N. Epidemiologia das Betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J Bras Patol Med Lab*. 2012;48(2):91-99.

- Dalmarco EM, Blatt SL, Mendes de Córdova CM. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. RBAC. 2006;38(3):171-177.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. Int J Med Microbiol. 2013;303(6-7):305-17.
- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):417-33.
- Deng Y, Zeng Z, Chen S, He L, Liu Y, Wu C, *et al.* Dissemination of IncFII plasmids carrying *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* from pigs, farm workers and the environment. Clin Microbiol Infect. 2011;17(11):1740-5.
- Díaz PQ, Bello HT, Dominguez MY, Trabal NF, Mella SM, Zemelman RZ, *et al.* Resistência a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. Rev Méd Chile. 2004; 132:1173-1178
- Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis. 2007;45(1):88-94.
- Echevarría-Zarate J, Sarmiento E, Osoro-Plenge F. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Acta Med. Per. 2006;23(1).
- Economou V, Gousia P. Agriculture and fod animals as a source of antimicrobial bacteria. Infect Drug Resist. 2015;8:49-61
- Elgorriaga-Islas E, Guggiana-Nilo P, Domínguez-Yévenes M, González-Rocha G, Mella-Montecinos S, Labarca-Labarca J, *et al.* Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *aac(6')-Ib-cr* among ESBL producing enterobacteria isolates from Chilean hospitals. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(8):466-8.
- Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The Integron: Adaptation On Demand. Microbiol Spectr. 2015;3(2):1-22
- Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Reviews in Medical Microbiology. 2013;24:7–17.

Fernández-Martínez M, Miró E, Ortega A, Bou G, González-López JJ, Oliver A, *et al.* Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(2):157-63.

Foster RT. Uncomplicated Urinary Tract Infections. Women. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 2008;35:235–248.

Foxman B. Epidemiology of Urinary Tract Infections: Incidence, Morbidity, and Economic Costs. *The American Journal of Medicine*. 2002;113(1A):5S-13S.

Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*. 2016. [acesso em 2016 oct 22]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>

Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of Methyltransferases Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1843-5.

Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistance bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(1):36-45.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(4):354-60.

Gerhold G, Schulze MH, Gross U, Bohne W. Multilocus sequence typing and CTX-M characterization of ESBL-producing *E. coli*: a prospective single-centre study in Lower Saxony, Germany. *Epidemiol Infect*. 2016;30:1-5.

Gillings MR. Integrons: past, present and future. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(2):257-77.

Glaser AP, Schaeffer AJ. Urinary Tract Infection and Bacteriuria in Pregnancy. *Urol Clin North Am*. 2015;42(4):547-60.

Gonçalves LF, de Oliveira Martins-Júnior P, de Melo AB, da Silva RC, de Paulo Martins V, Pitondo-Silva A, de Campos TA. Multidrug resistance dissemination by

extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016;6:1-4.

Guimarães DE, Das Silva LM, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova.* 2010;33(3):667-669.

Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, *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.* 2011;52(5):e103-20.

Gupta K, Hooton TM, Wobbe CL, Stamm WE. The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 1999;11(3-4):305-8.

Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. *Journal Antimicrobial Chemotherapy.* 2005;56(1):115-21.

Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(Suppl 1):i3-10.

Herzer P, Inouye S, Inouye M, Whittam T. Phylogenetic Distribution of Branched RNA-Linked Multicopy Single-Stranded DNA among Natural Isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 1990;172(11):6175-6181.

Hooton T, Besser R, Foxman B, Fritsche, TR, Nicolle L. Acute Uncomplicated Cystitis in an Era of Increasing Antibiotic Resistance: A Proposed Approach to Empirical Therapy. *Clinical Infectious Diseases.* 2004;39:75–80.

Institut Pasteur. 2013. *Escherichia coli* MLST database. [<http://bigsd.b.pasteur.fr/ecoli/ecoli.html>]

Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr.* 2014;2(5).

Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(1):161–182.

Jahandeh N, Ranjbar R, Behzadi P, Behzadi E. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes. *Cent European J Urol*. 2015;68(4):452-8.

Januszkiewicz A, Wołkiewicz T, Chróst A, Szych J. Characterization of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 isolated from human in Poland between 1996 and 2014. *Lett Appl Microbiol*. 2015;60(6):605-8.

Jarbas S, Vilar F, Mota L, Leal C, Pisi P. Urinary tract infection. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2010;43(2):118-25.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad/spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer betalactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*. 1988;10(4), 867-78.

Junior M, Ferreira ES, Conceição GC. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): Um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *NewsLab*. 2004;63:152-174.

Jure MA, Presti C, Cudman N, Grellet LM, Lopez C, Musa E, *et al.* β -lactamasas AmpC plasmídicas tipo CMY-2 emergentes en Tucumán, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 2011;43: 24-27.

Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson DG, Footer MJ, Hultgren SJ. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *PNAS*. 2004;101(5):1333–1338.

Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS Project. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(1):69-76.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):123-40.

Karisik E, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum β -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;61:54–58.

Karlowsky JA, Kelly LJ, Thornsberry C, Jones ME, Sahn DF. Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of *Escherichia coli* from Female Outpatients in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(8):2540-5.

Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315–317.

Kohler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *Int J Med Microbiol*. 2011;301(8):642-7.

Koneman WE, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. *Diagnóstico Microbiológico*. 2006;6ta edición:205 – 281.

Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Med Mal Infect*. 2014; 44(9):400-4.

Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):557-84.

Livermore DM. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean J Intern Med*. 2012;27(2):128-42.

Livermore DM. Mechanism of resistance to β -lactam antibiotics. *Scand J Infec Dis*. 1991;78:7-16.

Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Carini LC. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(2):155-161.

Magliano E, Grazioli V, Deflorio L, Leuci A, Mattina R, Romano P, Cocuzza CE. Gender and Age-Dependent Etiology of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:349597.

Maiden MCJ. Multilocus Sequence Bacteria. Annual Review of Microbiology. 2006;60:561-588.

Marchisio M, Porto A, Joris R, Rico M, Baroni MR, Di Conza J. Susceptibility to β -lactams and quinolones of Enterobacteriaceae isolated from urinary tract infections in outpatients. Braz J Microbiol. 2015;46(4):1155-9.

Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21(1):42-55.

Martínez-Martínez L, Calvo J. Desarrollo de las resistências a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(Supl 4):4-9.

Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 1998;351(9105):797-9.

Martínez-Martínez L. Mecanismos de adquisición de resistència a los antibióticos. JANO. 2006; 1.624:20-26

Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):565-91.

Mattar S, Martínez P. Emergence of antimicrobial resistance to extended-spectrum- β -lactamases (ESBL): detection, clinic impact and epidemiology. Infectio. 2007; 11(1): 23-35.

Mekitarian Filho E, Carvalho WB. Current management of occult bacteremia in infants. J Pediatr (Rio J). 2015;91(6 suppl 1):S61-S66.

Mella M, Sepúlveda A, González R, Bellot H, Domínguez Y, Zemelman Z, Ramírez G. Aminoglycosides-aminocyclitols: Structural characteristics and new aspects on resistance. Rev Chil Infect. 2004;21(4):330-338

Mendonça N, Louro D, Castro AP, Diogo J, Caniça M. CTX-M-15, OXA-30 and TEM-1-producing *Escherichia coli* in two Portuguese regions. J Antimicrob Chemother. 2006;57(5):1014-6.

- Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M. Distribution of phylogenetic groups and virulence factors in CTX-M-15 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients in the community of Mérida, Venezuela. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46(3):175-81.
- Minarini LA, Gales AC, Palazzo IC, Darini AL. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Curr Microbiol.* 2007;54(5):335-41.
- Mohkam M, Karimi A, Karimi H, Sharifian M, Armin S, Dalirani R, Abdollah-Gorgi F. Urinary Interleukin-8 in acute pyelonephritis of children. *Iran. J. Kidney. Dis.* 2008;2:193-196.
- Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachon J. Aminoglucósidos y Polimixinas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(3):178–188.
- Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R, *et al.* Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries.* 2011;5(12):840-9.
- Moya-Dionisio V, Díaz-Zabala M, Ibáñez-Fernández A, Suárez-Leiva P, Martínez-Suárez V, Ordóñez-Álvarez FA, *et al.* Uropathogen pattern and antimicrobial susceptibility in positive urinary cultures isolates paediatric patients. *Rev Esp Quimioter.* 2016;29(3):146-50.
- Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuk W, Ahmed R. Multi provincial *Salmonella* Typhimurium Case Control Study Group. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. *Journal Clinical Microbiology.* 2003; *J Clin Microbiol.* 2003;41(1): 460–462.
- Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be?. *CMAJ.* 2009;180(4):408-15.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller M, Tenover FC, Tenover RH. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In: *Manual of Clinical Microbiology.* American Society for Microbiology. 1999:442-455.

Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules*. 2016;21(4):268.

Najar MS, Saldanha CL, Banday KA. Approach to urinary tract infections. *Indian Journal of Nephrology*. 2009;19(4):129-139.

Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistência en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(7):524–534.

Ndoye B, Rasolofo EA, LaPointe G, Roy D. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Sci. and Technol*. 2011;91:495–524.

Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, *et al*. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(2):273-81.

Nicolle L, Peter A, Conly J, Mainprize T, Meuser J, Nickel C, *et al*. Uncomplicated urinary tract infection in women Current practice and the effect of antibiotic resistance on empiric treatment. *Canadian Family Physician*. 2006;52:612-618.

Nicolle LE. Urinary Tract Pathogens in Complicated Infection and in Elderly Individuals. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001;183(1):S5–8.

Nordberg V, Quizhpe Peralta A, Galindo T, Turlej-Rogacka A, Iversen A, Giske CG, Navér L. High Proportion of Intestinal Colonization with Successful Epidemic Clones of ESBL Producing Enterobacteriaceae in a Neonatal Intensive Care Unit in Ecuador. *PLoS One*. 2013;8(10):e76597.

Novais A, Pires J, Ferreira H, Costa L, Montenegro C, Vuotto C, *et al*. Characterization of Globally Spread *Escherichia coli* ST131 Isolates (1991 to 2010). *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3973-6.

Oliveira FA, Paludo KS, Arend L, Farah SM, Pedrosa FO, Souza EM, Surek M, Picheth G, Fadel-Picheth CMT. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genetics and Molecular Research*. 2011.

O'Mahony R, Quinn T, Drudy D, Walsh C, Whyte P, Mattar S, Fanning S. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* from food sources in Colombia: evidence for an unusual plasmid-localized class 1 integron in serotypes Typhimurium and Anatum. *Microb Drug Resist.* 2006;12(4):269-77.

Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.* 1992;38(7):699-704.

Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigo C, Bartoloni A, *et al.* Detection of CTX-M-type beta-lactamase genes in fecal *E. coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:4556–4561.

Pallecchi L, Riccobono E, Sennati S, Mantella A, Bartalesi F, Trigo C, *et al.* Characterization of Small ColE-Like Plasmids Mediating Widespread Dissemination of the *qnrB19* Gene in Commensal Enterobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):678-82.

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahn D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3953-5.

Partridge SR, Brown HJ, Hall RM. Characterization and Movement of the Class 1 Integron Known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1288-94.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews.* 2005;18(4):657–686.

Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2010;35(4):316-21

Peirano G, Agersø Y, Aarestrup FM, dos-Reis EM, Dos-Prazeres-Rodrigues D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):305-9.

Peirano G, Ahmed-Bentley J, Fuller J, Rubin JE, Pitout JD. Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1575-81.

Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JD. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(7):1039-43.

Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med*. 2010;362(19): 1804–1813.

Peng CF, Lee MF, Fu HT, Chen YJ, Hsu HJ. Characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in TX-M-3-producing *Serratia*. *Jpn J Infect Dis*. 2007;60(5):250-6.

Pérez-Cano HJ, Robles-Contreras A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistência bacteriana. *Revista Médica MD*. 2013;4(3):187-191.

Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2153-62.

Petty NK, Ben-Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, *et al*. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(15):5694-9.

Pitout JD, Laupland K. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(3):159-66.

Pitout JD. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:9.

Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN, Trott DJ. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol*. 2011;153:99-108.

Poletto KQ, Reis C. Susceptibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005;38(5):416-420.

Pulido IY, Mantilla JR, Valenzuela EM, Reguero MT, Gonzalez EB. Distribution of extended spectrum beta-lactamases-codifying genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals of Bogota, D.C., Colombia. *Biomedica*. 2011;31:15–20.

Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010;13(6):151-71.

Red-RAM, visto en <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/curso-whonet/>, 2016.

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006;12(1):83-8.

Rodriguez-Martinez JM, Cano ME, Velasco C, Martinez-Martnez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*. 2011;17:149–182

Rodríguez-Martínez JM. Mecanismos de resistência a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23(1):25-31

Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(1):1-14.

Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(3):196-203.

Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martinez E, *et al.* First Characterization of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 Clones Causing Community-Onset Infections in South America. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1993-6.

Russo TA, Johnson JR. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(5):1753–4.

Sabaté M, Prats G. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20(7):341-5.

- Salles MJC, Zurita J, Mejia C, Villegas V. Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiol Infect.* 2013;141(12):2459–2472.
- Sanchez JM, Guillan CG, Fuster C, Lopez R, Gonzáles W, Raya C, Garcia J. Evolución de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. *Arch. Esp. Urol.* 2008;61(7):776-780.
- Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiological Letters.* 1997;160(1):37-41.
- Sandvang D. Novel streptomycin and spectinomycin resistance gene as a gene cassette within a class 1 integron isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(12):3036-8.
- Santos MA, Campos AC, Silva RM, Matos AC, Gales AC. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence regarding host age and sex. *O Mundo da Saúde, São Paulo.* 2009;33(4):392-400.
- Schaeffer AJ. What Do We Know about the Urinary Tract Infection–Prone Individual. *The Journal of Infectious Diseases.* 2001; 183(Suppl. 1):S66–9.
- Schembri MA, Zakour NL, Phan MD, Forde BM, Stanton-Cook M, Beatson SA. Molecular characterization of the Multidrug Resistant *Escherichia coli* T131 Clone. *Pathogens.* 2015;4:422-30.
- Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, *et al.* Changing Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):6003-5.
- Seral C, Gude MJ, Castillo FJ. Emergence of plasmid mediated AmpC β -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options. *Rev Esp Quimioter.* 2012;25(2):89-99.
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Microbiol Rev.* 1993;57(1):138-63.

Solorzano A, Jimenez-Pacheco A, de Dios Luna Del Castillo J, Sampedro A, Martinez-Brocal A, Miranda-Casas C, *et al.* Evolution of the resistance to antibiotics of bacteria involved in urinary tract infections: A 7-year surveillance study. *Am J Infect Control.* 2014;42(10):1033-8.

Stackebrandt E, Murray RGE, Truper HG. Proteobacteria classis nov. a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *Int J Syst Bacteriol.* 1988; 38(3):321-325.

Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, *et al.* Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *MBio.* 2016;7(2):e02162.

Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664-89.

Suárez C, Gudiol F. Antibióticos Betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(2):116–129.

Suwanarat N, Rudin SD, Marshall SH, Hujer AM, Perez F, Hujer KM, *et al.* Infections caused by fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* following transrectal ultrasound-guided biopsy of the prostate. *J Glob Antimicrob Resist.* 2014;2(2):71-76.

Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(3):207-17.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.

Tsukamoto N, Ohkoshi Y, Okubo T, Sato T, Kuwahara O, Fujii N, Tamura Y, Yokota S. High Prevalence of Cross-Resistance to Aminoglycosides in Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Chemotherapy.* 2013;59(5):379-84.

Vakulenko SB, Mobashery S. Versality of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):430-50.

Valdevenito JP. Infección urinaria recurrente en la mujer. Rev Chil Infect. 2008;25(4): 268-276.

Vallejos C, López M, Enríquez M, Ramírez B. Prevalencia de infecciones de vías urinarias en embarazadas atendidas en el Hospital Universitario de Puebla. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 2010;30(4):118-122.

Vieira M. Infecção do trato urinário. Medicina Ribeirão Preto. 2003;36(4):365 – 369.

Villegas MV, Blanco MG, Sifuentes-Osorio J, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America – 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Braz J Infect Dis. 2011;15(1):34-39.

Villegas MV, Kattani JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum b-lactamases in South America. Clin Microbiol Infect. 2008;14 (Suppl 1):154-8.

Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. Drug Resist Updat. 2012;15(3):133-48.

Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaffer AJ, Stamm WE. Guidelines for Antimicrobial Treatment of Uncomplicated Acute Bacterial Cystitis and Acute Pyelonephritis in Women. Clinical Infectious Diseases. 1999;29(4):745–58.

Weichhart T, Haidinger M, Hörl WH, Säemann MD. Current concepts of molecular defence mechanisms operative during urinary tract infection. Eur J Clin Invest. 2008; 38(S2):29–38.

Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and Molecular Pathology. 2008;85(1):11-19.

Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and Molecular Pathology. 2008;85:11–19.

Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 2005;8:525–533.

Wollheim C, Guerra IM, Conte VD, Hoffman SP, Schreiner FJ, Delamare AP, *et al.* Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(2):138-43.

Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. Complete Nucleotide Sequences of Plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, Encoding CTX-M Enzymes in Three Major *Escherichia coli* Lineages from the United Kingdom, All Belonging to the International O25:H4-ST131 Clone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(10):4472-82

World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014,12. Em: <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2016/08/2014.compressed.pdf>.

Wurgaft AK. Infecciones del Tracto Urinario. *Rev. Med. Clin. Condes*. 2010;21(4):629-633.

Yamamoto S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Chemother*. 2007;13:68–73.

Yamamoto S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. **J Infect Chemother**, 2007; 13:68–73.

Yang J, Ye L, Wang W, Luo Y, Zhang Y, Han L. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(4):348-51.

Zorc JJ, Kiddoo DA, Shaw KN. Diagnosis and Management of Pediatric Urinary Tract Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):417-22.

Zurfluh K, Nüesch-Inderbinnen M, Morach M, Zihler-Berner A, Hächler H, Stephan R. Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Vegetables Imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(9):3115-20.

9 APÊNDICES E/OU ANEXOS

PRODUTOS OBTIDOS (ARTIGOS CIENTÍFICOS, RESUMOS EM CONGRESSOS)

Tema	Evento	Apresentação	Data
Detecção genotípica de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos <i>aac(3)-IIa</i> , <i>ant(2)-Ia</i> e <i>aac(6)-Ib</i> em cepas de <i>Escherichia coli</i> uropatogênica de origem comunitária e hospitalar em Quito-Ecuador	XXI ALAM, Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Santos - Brasil	Poster	28 outubro a 01 novembro, 2012
Epidemiologia molecular das β -lactamases de espectro estendido ESBL e AmpC em <i>Escherichia coli</i> uropatogênica, na cidade de Quito – Ecuador.	XXI ALAM, Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Santos - Brasil	Poster	28 outubro a 01 novembro, 2012
Caracterización molecular de <i>Escherichia coli</i> uropatogénica resistentes a los antibióticos β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos aislados en Quito, Ecuador.	II Taller Internacional de la Red Latinoamericana de Epidemiología Molecular y Genética Evolutiva (Latin-American Network of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases LAN MEEGID) y en el “III Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical”, Quito Ecuador.	Palestra	21 a 23 julio, 2014
Estudio molecular de la región variable del Integrón tipo 1, en muestras de <i>Escherichia coli</i> uropatogénica multiresistentes a antibióticos, aisladas en Quito - Ecuador	II Taller Internacional de la Red Latinoamericana de Epidemiología Molecular y Genética Evolutiva (Latin-American Network of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases LAN MEEGID) y en el “III Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical”, Quito Ecuador.	Palestra	21 a 23 julio, 2014
Resistência a ciprofloxacina mediada por genes plasmídicos <i>qnr</i> y <i>aac(6)-Ib-cr</i> en cepas de <i>Escherichia coli</i> uropatogénica aisladas en Quito, Ecuador.	XVII Congreso Panamericano de Infectología, Quito - Ecuador.	Palestra	15 a 19 maio, 2015
Detection of the Pandemic <i>Escherichia coli</i> O25-ST131 CTX-M-15-Producing Clone	Submetido: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica con el número		

Harboring Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Determinants and Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs) Genes, in Ecuador. [EIMC-D-16-00400](#). Fator Impacto: 1.5

Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* in Quito, Ecuador. [Submission IJMM 2016 175 received by International Journal of Medical Microbiology](#). Fator Impacto: 1.4
