

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



Infecção urinária na comunidade: porquê a sua
prevalência?

Ana Catarina Faria Guerreiro

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Lisboa, Fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**Infecção urinária na comunidade: porquê a sua
prevalência**

Ana Catarina Faria Guerreiro

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Maria Aida Duarte

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Lisboa, Fevereiro de 2012

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação

Resumos publicados em revistas com circulação internacional:

Guerreiro A, Duarte A, Ramalheiro A. Community-acquired urinary tract infection: prevalence and resistance – a one year experience. *Clinical Microbiology and Infection* 2012 (em publicação).

Participação em congressos:

Guerreiro A, Duarte A, Ramalheiro A. Community-acquired urinary tract infection: prevalence and resistance – a one year experience. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) London, 31.03.2012-03.04.12. R2666.

Agradecimentos

A realização desta dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma directa ou indirecta, de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento, em particular:

À Prof^a Dr^a Maria Aida Duarte, orientadora desta dissertação, agradeço em primeiro lugar a oportunidade que me deu de participação neste projecto de investigação. Agradeço ainda o apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho.

Às minhas colegas do Laboratório de Análises Clínicas Dr. Jorge Leitão Santos pela ajuda e apoio.

À empresa bioMérieux pela cedência de alguns meios de cultura.

Por último, mas não menos importante, à minha família e amigos pelo apoio e compreensão nos momentos de maior indisponibilidade, e pelo encorajamento a fim de prosseguir a elaboração deste trabalho.

Resumo

A infecção do tracto urinário (ITU) é uma das doenças infecciosas mais comuns. A resistência aos antibióticos é um problema de saúde pública com importantes implicações económicas e sociais.

Na primeira parte deste estudo foi analisada a prevalência da ITU na comunidade durante o ano de 2010. Foram analisadas 8869 urinas. Foi encontrada uma prevalência de infecção urinária de 18% na população estudada. *E.coli* foi o principal agente etiológico encontrado (64,9%), seguido de *K.pneumoniae* (10,5%), *P.mirabilis* (9,1%) e *E.faecalis* (6,3%). Foram isoladas outras espécies mas com prevalências inferiores a 2%.

Foi encontrada uma elevada taxa de resistência nos uropatógenos estudados. 53,9% das estirpes isoladas apresentava pelo menos resistência a um dos antibióticos testados. Cerca de 41% dos isolados de *E.coli* apresentava resistência à amoxicilina, 27,3% ao trimetoprim/sulfametoxazol e 19,9% à norfloxacin. 41,4% dos isolados de *P.mirabilis* apresentava resistência à amoxicilina, 29,7% ao trimetoprim/sulfametoxazol e 20,7% à norfloxacin. 27% dos isolados de *K.pneumoniae* apresentava resistência à nitrofurantoína, 23,2% à norfloxacin e 19,6% ao trimetoprim/sulfametoxazol. Para as três espécies o antibiótico utilizado por via oral para o qual se encontrou menor taxa de resistência foi a fosfomicina.

Foram detectados e sequenciados os seguintes genes de resistência a antibióticos: *dfrA₇*, *dfrA₁₇*, *dfrA₂₅*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV-2}*, *bla_{CTX-M-15}*, *qnrB₂*, *qnrB₄*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *fosA* e *fosA₃*.

O gene *fimH* foi encontrado em 95,2% dos isolados de *K.pneumoniae*, o gene *khe* em 100% dos isolados e o gene *mrkD* em 85,7%. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para os factores de virulência estudados entre o grupo de bactérias sensíveis e as resistentes.

O gene *fimH* foi encontrado em 73,8% dos isolados de *E.coli*, o gene *papC* em 38,8% dos isolados e o gene *ecpA* em 62,4% dos isolados. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o grupo de bactérias sensíveis e as resistentes.

Através da reacção de BOX PCR *fingerprinting* obtiveram-se perfis electroforéticos semelhantes para estirpes isoladas do mesmo doente, o que pode indicar episódios de infecção recorrente com o mesmo clone bacteriano.

Com este estudo pretendeu-se conhecer a realidade específica da comunidade estudada de modo a futuramente poder informar os clínicos da região para que estes possam fazer uma prescrição de antibióticos mais adequada.

Palavras chave: *E.coli*, *K.pneumoniae*, resistência, virulência, *fimH*, *ecpA*, *papC*, *khe*, *mrkD*, *bla_{CTX}*, *bla_{TEM}*, *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *fosA*, *fosA₃*.

Abstract

Urinary tract infection (UTI) is one of the most common infectious diseases. Antimicrobial resistance is a public health problem with important social and economic consequences.

In the first part of this study, it was analysed the prevalence of UTI in the community in the year 2010. 8869 urine samples were analysed. It was found a prevalence of 18% of UTI in the population studied. *E.coli* was the main etiological agent found (64,9%), followed by *K.pneumoniae* (10,5%), *P.mirabilis* (9,1%) and *E.faecalis* (6,3%). Other species were isolated but with prevalence below 2%.

An elevated level of resistance was found in the uropathogens studied. 53,9% of the species isolated showed at least resistance to one of the tested antibiotics. Around 41% of *E.coli* isolates showed resistance to amoxicillin, 27,3% to trimethoprim/sulfamethoxazole and 19,9% to norfloxacin. 41,4% of *P.mirabilis* isolates showed resistance to amoxicillin, 29,7% to trimethoprim/sulfamethoxazole and 20,7% to norfloxacin. 27% of *K.pneumoniae* isolates showed resistance to nitrofurantoin, 23,2% to norfloxacin and 19,6% to trimethoprim/sulfamethoxazole. For the three species the antibiotic for which the lowest resistance was found was fosfomicin.

The following resistance genes were detected and sequenced: *dfrA₇*, *dfrA₁₇*, *dfrA₂₅*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV-2}*, *bla_{CTX-M-15}*, *qnrB₂*, *qnrB₄*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *fosA* and *fosA₃*.

The *fimH* gene was found in 95,2% of *K.pneumoniae* isolates, the *khe* gene in all isolates, and the *mrkD* gene in 85,7%. It wasn't found a significative statistical difference for the presence of virulence factors between the group of bacteria with and without resistance to antibiotics.

Through the BOX PCR fingerprinting reaction, similar electrophoretic profiles were obtained, for samples isolated from the same patient, which could indicate the occurrence of episodes or recurrent infection with the same bacterial clone.

With this study it was pretended to know the specific reality of the studied community in order to, in the future, be able to inform the clinicians of the region and they can prescribe antibiotics in the adequate mode.

Keywords: *E.coli*, *K.pneumoniae*, *resistance*, *virulence*, *fimH*, *ecpA*, *papC*, *khe*, *mrkD*, *bla_{CTX}*, *bla_{TEM}*, *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *fosA*, *fosA₃*

Índice

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA DISSERTAÇÃO	I
AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. INFECÇÃO URINÁRIA	1
1.1.1. CLASSIFICAÇÃO	1
1.1.2. PREVALÊNCIA DA ITU	2
1.1.3. ITU RECORRENTES	3
1.1.4. VIAS DE INFECÇÃO	3
1.1.5. AGENTES ETIOLÓGICOS	4
1.1.6. DIAGNÓSTICO DA ITU	6
1.1.7. TRATAMENTO DA ITU	7
1.2. FACTORES DE VIRULÊNCIA	9
1.2.1. FACTORES DE VIRULÊNCIA DE <i>E. COLI</i>	9
1.2.1.1. Fímbrias tipo 1	11
1.2.1.2. Fímbrias P	11
1.2.1.3. Pílus ECP	12
1.2.2. FACTORES DE VIRULÊNCIA DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	13
1.2.2.1. Hemolisina KHE	13
1.2.2.2. Fímbrias tipo 1	13
1.2.2.3. Fímbrias tipo 3	14
1.3. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	15
1.3.1. INTEGRÕES	16
1.3.2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS	18
1.3.3. QUINOLONAS	20
1.3.3.1. Gene <i>qnr</i>	21
1.3.3.2. Gene <i>aac(6')-Ib-cr</i>	23

1.3.4. FOSFOMICINA	23
1.3.5. TRIMETOPRIM	24
1.4. TIPAGEM MOLECULAR - PCR FINGERPRINTING	25
1.5. OBJECTIVOS	26
2. - MATERIAL E MÉTODOS	27
<hr/>	
2.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS EXPERIÊNCIAS	27
2.2. ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA ITU EM 2010	27
2.3. ESTUDO DA RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM 2011	30
2.3.1. ESTIRPES BACTERIANAS	30
2.3.2. PURIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS	30
2.3.3. ISOLAMENTO DO DNA	31
2.3.4. AMPLIFICAÇÃO DE GENES POR REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)	31
2.3.5. ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR	34
2.3.6. PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR	35
2.3.7. SEQUENCIAÇÃO DO DNA	35
2.3.8. MÉTODO INFORMÁTICOS	36
2.3.9. TIPIFICAÇÃO MOLECULAR	36
2.3.10. TESTES FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA - PESQUISA DE β -LACTAMASES	37
2.3.10.1. Pesquisa de metalo- β -lactamases (MBL) – teste de inibição com EDTA	37
2.3.10.2. Pesquisa de AmpC - Teste de inibição com a cloxacilina	38
2.3.10.3. Pesquisa de KPC e ESBL - Teste de Inibição com ácido borónico	38
2.3.10.4. Pesquisa de β -lactamase utilizando um kit comercial	39
3. RESULTADOS	41
<hr/>	
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA – 1ª PARTE	41
3.2. AGENTES ETIOLÓGICOS	46
3.2.1. <i>E. COLI</i>	48
3.2.2. <i>K. PNEUMONIAE</i>	49
3.2.3. <i>P. MIRABILIS</i>	50
3.2.4. <i>E. FAECALIS</i>	52
3.3. ITU NA MULHER GRÁVIDA	53
3.4. ITU EM DIABÉTICOS	55
3.5. ITU EM LARES	56
3.6. RESISTÊNCIAS AOS ANTIBIÓTICOS	57
3.7. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA – 2ª PARTE	59
3.8. ANTIBIOGRAMAS	60
3.9. PESQUISA DE β-LACTAMASES	65
3.9.1. PESQUISA DE METALO- β -LACTAMASES	65
3.9.2. PESQUISA DE β -LACTAMASES AMPC	66
3.9.3. PESQUISA DE ESBL E KPC - TESTE DE INIBIÇÃO COM O ÁCIDO BORÓNICO	67

3.9.4. PESQUISA DE ESBL E AMPC UTILIZANDO KITS COMERCIAIS	68
3.10. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA	68
3.11. FACTORES DE VIRULÊNCIA DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	75
3.12. FACTORES DE VIRULÊNCIA DE <i>E. COLI</i>	76
3.12.1. GENE <i>ECPA</i>	78
3.12.2. GENE <i>FIMH</i>	79
3.12.3. GENE <i>PAPC</i>	79
3.13. ANÁLISE DA RELAÇÃO CLONAL	80
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	82
<hr/>	
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

Lista de Tabelas

TABELA 1: TERAPÊUTICA ANTIMICROBIANA EMPÍRICA RECOMENDADA NA CISTITE AGUDA	8
TABELA 2 - REGIMES DE TRATAMENTO PARA A BACTERIÚRIA ASSINTOMÁTICA E CISTITE NA GRAVIDEZ .	9
TABELA 3 - FACTORES DE VIRULÊNCIA NA <i>E.COLI</i> UROPATOGÉNICA: ESTRUTURAS DE SUPERFÍCIE.	10
TABELA 4 - FACTORES DE VIRULÊNCIA NA <i>E.COLI</i> UROPATOGÉNICA: FACTORES EXPORTADOS.	10
TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS URINÁRIAS COM PEDIDO DE UROCULTURA POR LOCALIDADE	27
TABELA 6– ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS GALERIAS ATB-UR.....	28
TABELA 7 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS CARTAS VITEK AST N-113 - ENTEROBACTÉRIAS	29
TABELA 8 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS CARTAS VITEK AST N-093 BACIOS GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES.....	29
TABELA 9 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS CARTAS VITEK AST P-586 – <i>STREPTOCOCCUS</i> SP E <i>ENTEROCOCCUS</i> SP.....	29
TABELA 10 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS CARTAS VITEK AST -P580 – <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SP	30
TABELA 11 – SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA E FACTORES DE VIRULÊNCIA	32
TABELA 12 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR – PROGRAMAS UTILIZADOS	33
TABELA 13 – TAMPÕES UTILIZADOS NA ELECTROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR	35
TABELA 14 – CONDIÇÕES DE PCR PARA O ENSAIO BOX-PCR <i>FINGERPRINTING</i>	36
TABELA 15 – DISTRIBUIÇÃO DOS PEDIDOS DE UROCULTURA POR MÊS E SEXO	41
TABELA 16 – DISTRIBUIÇÃO DAS URINAS E ISOLADOS POSITIVOS POR LOCALIDADE.....	42
TABELA 17– DISTRIBUIÇÃO DAS UROCULTURAS POSITIVAS POR MÊS E SEXO	43
TABELA 18 – DISTRIBUIÇÃO DO Nº DE UROCULTURAS POSITIVAS EM FUNÇÃO DO GRUPO ETÁRIO E SEXO	45
TABELA 19 – CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM INFECÇÃO URINÁRIA	45
TABELA 20 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS ISOLADAS COM MAIOR FREQUÊNCIA DE ACORDO COM O SEXO.....	47
TABELA 21 - DISTRIBUIÇÃO DE <i>E.COLI</i> DE ACORDO COM O SEXO E GRUPO ETÁRIO	48
TABELA 22 - DISTRIBUIÇÃO DE <i>K.PNEUMONIAE</i> DE ACORDO COM O SEXO E GRUPO ETÁRIO	49
TABELA 23 - DISTRIBUIÇÃO DE <i>P.MIRABILIS</i> DE ACORDO COM O SEXO E GRUPO ETÁRIO	51
TABELA 24- DISTRIBUIÇÃO DE <i>E.FAECALIS</i> DE ACORDO COM O SEXO E GRUPO ETÁRIO.....	52
TABELA 25 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS ISOLADAS NA GRÁVIDA.....	53
TABELA 26 – RESISTÊNCIAS DE <i>E.COLI</i> , <i>K.PNEUMONIAE</i> E <i>P.MIRABILIS</i> AOS ANTIBIÓTICOS	57
TABELA 27 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	60
TABELA 28 – ANTIBIOGRAMA DAS AMOSTRAS ANALISADAS	61
TABELA 29 – TESTE DE INIBIÇÃO COM EDTA.....	65
TABELA 30 – TESTE DE INIBIÇÃO COM CLOXACILINA	66
TABELA 31 – TESTE DE INIBIÇÃO COM ÁCIDO BORÓNICO	67
TABELA 32 – TESTE COM MASTDISCS.....	68
TABELA 33 – RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS ESTIRPES DE <i>E.COLI</i>	69
TABELA 33– RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS ESTIRPES DE <i>E.COLI</i> (CONT.)	70
TABELA 33 – RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS ESTIRPES DE <i>E.COLI</i> (CONT.)	71
TABELA 34– RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS ESTIRPES DE <i>K.PNEUMONIAE</i>	72
TABELA 35 – RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS AMOSTRAS DE <i>K.PNEUMONIAE</i> SENSÍVEIS.....	75
TABELA 36 – RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PARA OS FACTORES DE VIRULÊNCIA DE <i>K.PNEUMONIAE</i>	76
TABELA 37– RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS AMOSTRAS DE <i>E.COLI</i> SENSÍVEIS	77

TABELA 37 – RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS AMOSTRAS DE *E.COLI* SENSÍVEIS
(CONT.) 78

TABELA 38 – RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PARA OS FACTORES DE VIRULÊNCIA DE *E.COLI*
..... 80

Lista de Figuras

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FÍMBRIAS TIPO 1 E P	12
FIGURA 2- ESTRUTURA DE UM INTEGRÃO	17
FIGURA 3 – GENE RULER® 1 KB DNA LADDER	35
FIGURA 4 – ESQUEMA DO TESTE DE INIBIÇÃO COM EDTA	37
FIGURA 5 – ESQUEMA DO TESTE DE INIBIÇÃO COM CLOXACILINA	38
FIGURA 6 – ESQUEMA DO TESTE DE INIBIÇÃO COM ÁCIDO BORÓNICO.....	39
FIGURA 7 – ESQUEMA DO TESTE UTILIZANDO DISCOS MAST ID®	40
FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE UROCULTURAS POSITIVAS POR DISTRITO E CONCELHO.....	42
FIGURA 9 - PERCENTAGEM DE UROCULTURAS POSITIVAS POR MÊS E SEXO.	43
FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE UROCULTURAS POSITIVAS EM MULHERES EM FUNÇÃO DA IDADE	44
FIGURA 11 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE UROCULTURAS POSITIVAS EM HOMENS EM FUNÇÃO DA IDADE.....	44
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA ITU	46
FIGURA 13 - DISTRIBUIÇÃO EM PERCENTAGEM DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA INFECÇÃO URINÁRIA ..	46
FIGURA 14 – NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>E. COLI</i> NO SEXO FEMININO POR IDADE.....	48
FIGURA 15 – NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>E. COLI</i> NO SEXO MASCULINO POR IDADE	49
FIGURA 16 – NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>K. PNEUMONIAE</i> NO SEXO FEMININO POR IDADE	50
FIGURA 17 – NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>K. PNEUMONIAE</i> NO SEXO MASCULINO POR IDADE	50
FIGURA 18– NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>P. MIRABILIS</i> NO SEXO FEMININO POR IDADE	51
FIGURA 19 – NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>P. MIRABILIS</i> NO SEXO MASCULINO POR IDADE	51
FIGURA 20 – NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>E. FAECALIS</i> NO SEXO FEMININO POR IDADE	52
FIGURA 21 – NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>E. FAECALIS</i> NO SEXO MASCULINO POR IDADE	53
FIGURA 22 – DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA INFECÇÃO URINÁRIA NA MULHER GRÁVIDA	54
FIGURA 23 – DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA INFECÇÃO URINÁRIA NA MULHER GRÁVIDA	54
FIGURA 24 – DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA INFECÇÃO URINÁRIA EM DIABÉTICOS DO SEXO MASCULINO.	55
FIGURA 25 – DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS NA INFECÇÃO URINÁRIA EM DIABÉTICO DO SEXO FEMININO.....	55
FIGURA 26– DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS NA INFECÇÃO URINÁRIA EM PACIENTES PROVENIENTES DE LARES – SEXO MASCULINO.....	56
FIGURA 27 – DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS NA INFECÇÃO URINÁRIA EM PACIENTES PROVENIENTES DE LARES – SEXO FEMININO	56
FIGURA 28 – PERCENTAGEM DE RESISTÊNCIAS OBSERVADAS NOS PRINCIPAIS MICROORGANISMOS ISOLADOS	58
FIGURA 29 – AMOSTRA 14 – <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> - RESULTADO DO TESTE DE INIBIÇÃO COM EDTA	65
FIGURA 30 – RESULTADO DO TESTE DE INIBIÇÃO COM CLOXACILINA.....	66
FIGURA 31 – TESTE DE INIBIÇÃO COM O ÁCIDO BORÓNICO.....	67
FIGURA 32 – AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS GENES DE RESISTÊNCIA <i>BLA_{TEM}</i>	73
FIGURA 33 - ALINHAMENTOS DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DE DO GENE <i>DFRA₇</i> E DO PRODUTO DE PCR SEQUENCIADO DA AMOSTRA 3.....	74
FIGURA 34 – FACTORES DE VIRULÊNCIA DE <i>K. PNEUMONIAE</i> TESTADOS NAS ESTIRPES RESISTENTES E SENSÍVEIS.....	76
FIGURA 35 – <i>ECPA</i> NAS ESTIRPES DE <i>E. COLI</i> ANALISADAS	79

FIGURA 36 – *FIMH* NAS ESTIRPES DE *E. COLI* ANALISADAS 79
FIGURA 37 – *PAPC* NAS ESTIRPES DE *E. COLI* ANALISADAS 80
FIGURA 38 – RESULTADO DO BOX PCR – *FINGERPRINTING*..... 81

Lista de Abreviaturas

- ITU – Infecção do trato urinário
- SGB – *Streptococcus* do Grupo B
- UFC – Unidades formadoras de colónias
- CPS ID3– Meio de cultura
- UPEC – *Escherichia coli* uropatogénica
- LPS – Lipopolissacárido
- IBC – Reservatórios bacterianos intracelulares
- ECP – *Escherichia coli common pilus*
- PBP – proteínas de ligação à penicilina
- ESBL – β -lactamase de espectro alargado
- CMI – concentração mínima inibitória
- DHFR – dihidrofolato redutase
- PCR – *Polymerase Chain Reaction*
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- AMX – Amoxicilina
- AMC – Amoxicilina + ácido clavulânico
- CF – Cefalotina
- CXM – Cefuroxima
- CAZ – Ceftazidima
- CTX – Cefotaxima
- FOX – Cefoxitina
- FEP – Cefepima
- NOR – Norfloxacin
- CIP – Ciprofloxacina
- G – Gentamicina
- A – Amicacina
- T – Tobramicina

SXT – Trimetoprim + sulfametoxazol = Cotrimoxazol

F – Fosfomicina

FN – Nitrofurantóina

IMI – Imipenem

ERT – Ertapenem

TIC – Ticarcilina

ATM - Aztreonam

ABE – Água bidestilada estéril

MBL – Metallo- β -lactamase

1. Introdução

1.1. Infecção urinária

1.1.1. Classificação

A infecção do tracto urinário (ITU) é uma das doenças infecciosas mais frequentes no ser humano que pode ocorrer desde a infância até à idade avançada, afectando quer pessoas saudáveis quer com a saúde debilitada^[1, 2].

A patogénese e curso das ITU são grandemente influenciadas pela anatomia dos órgãos envolvidos: uretra, bexiga, ureteres, próstata e rins^[3].

A classificação da ITU depende da parte do tracto urinário que está colonizado (tracto urinário inferior ou superior), bem como da predisposição individual. A cistite (ITU inferior) é caracterizada por desconforto, especialmente pré e imediatamente pós-micção, micção frequente ou urgente e dor suprapúbica. A pielonefrite aguda (ITU superior) é, a maioria das vezes, um problema mais grave e é clinicamente identificada por febre, dor lombar, náuseas e por vezes vómitos^[4].

De acordo com as *Guidelines on Urological Infections* da *European Association of Urology* as infecções urológicas são classificadas do seguinte modo^[5]:

- ITU baixo não complicada (cistite)
- Pielonefrite não complicada
- ITU complicada com ou sem pielonefrite
- Urosépsis
- Uretrite
- Prostatite, epididimite e orquite

A ITU aguda não complicada nos adultos inclui episódios de cistite aguda e pielonefrite aguda em indivíduos saudáveis. Estas ITU são encontradas mais comumente em mulheres sem anomalias estruturais ou funcionais relevantes do tracto urinário, sem doenças renais ou comorbilidades que possam conduzir a consequências mais graves^[5].

Uma ITU complicada é uma infecção associada com condições, tais como anomalias estruturais ou funcionais do tracto genito-urinário, ou a presença de doenças subjacentes que interferem com os mecanismos de defesa do hospedeiro, que aumentam os riscos de adquirir infecção ou de falhar a terapêutica^[5].

A diferenciação entre ITU complicada e não complicada tem implicações no que diz respeito à avaliação pré e pós-tratamento, tipo e duração da terapêutica antimicrobiana e extensão da avaliação do tracto urinário^[6].

1.1.2. Prevalência da ITU

A prevalência da ITU em ambos os sexos e nos distintos grupos etários é variável. Nos três primeiros meses de vida a ITU é mais frequente no sexo masculino devido a alterações estruturais como a presença de válvulas uretrais posteriores. A partir dessa idade a ITU é mais frequente nas meninas devido a uma causa funcional, o refluxo da urina por incompetência das válvulas vesico-uretrais, que corrige espontaneamente com a puberdade. Nos meninos a ITU pode produzir-se, tal como no recém-nascido, de forma secundária à presença de alterações estruturais importantes que geralmente necessitam de correcção cirúrgica. Aproximadamente dos 15 aos 50 anos a ITU é praticamente inexistente no homem^[2,6], enquanto que na mulher tem uma prevalência que pode alcançar até 3% da população. A actividade sexual é um factor de risco importante nestes casos^[2].

A cistite aguda é extremamente comum entre mulheres em idade reprodutiva, enquanto que a pielonefrite aguda, muito menos comum, está associada com elevados custos por episódio e morbilidade. Juntas, cistite e pielonefrite são grandes contribuidores para a carga global da saúde e custos atribuídos às ITU nas mulheres^[7].

A duração média dos sintomas associados à ITU aguda é de cerca de seis dias, com 2,4 dias de restrição da actividade e 1,2 dias de tempo de trabalho perdido^[8].

Pelo menos 50% das mulheres têm uma infecção urinária não complicada durante a sua vida^[6, 9].

A frequência de ITU aumenta durante a gravidez e constitui um risco para a mãe (pielonefrite, pré-eclampsia, eclampsia, hipertensão) e para o feto (prematuridade, baixo peso ao nascimento, morte perinatal). 20-40% dos casos de bacteriúria assintomática associada à gravidez evoluem para pielonefrite o que pode originar lesões renais e problemas fetais tais como atraso no crescimento intra-uterino, prematuridade, risco de morte perinatal e anomalias congénitas^[2].

Em ambos os sexos, a partir dos 50 anos, as modificações anatómicas (hipertrofia prostática no homem) e fisiológicas (menopausa na mulher) predispõem a ITU, às vezes crónica e frequentemente assintomática ou tolerada local e sistemicamente ao ponto de ser considerada por alguns como uma consequência normal do envelhecimento, que na maioria dos casos não precisa de tratamento antimicrobiano^[2].

A grande diferença na prevalência da ITU entre homens e mulheres resulta de uma variedade de factores^[6]:

- maior distância entre o ânus (a fonte usual de uropatógenos) e o meato uretral
- o ambiente mais seco que rodeia a uretra masculina
- o maior comprimento da uretra masculina
- a actividade antibacteriana do fluido prostático.

Em mulheres com diabetes mellitus as ITU ocorrem mais frequentemente do que em mulheres sem diabetes, são mais graves e podem provocar complicações que noutros casos são raras^[10]. A bacteriúria assintomática é comum em mulheres diabéticas. A diabetes mellitus aumenta o risco de pielonefrite aguda a partir de infecção por *Enterobacteriaceae* com origem no tracto urinário inferior. A infecção por *Klebsiella* é particularmente comum. A glicosúria inibe a fagocitose e talvez a imunidade celular e encoraja a adesão bacteriana^[5].

1.1.3. ITU recorrentes

20 a 30 % das mulheres têm infecções urinárias recorrentes^[6, 8], a uma taxa de duas ou mais por ano, que requerem cuidados médicos e tratamento antimicrobiano^[8].

As infecções recorrentes classificam-se, segundo a patogenia em recidivas ou reinfeções. Estas são devidas a novas infecções causadas pela mesma estirpe ou por uma diferente, e no caso da mulher jovem produzem-se em mais de 20% das que tiveram um primeiro episódio de cistite^[2].

Um grande número de estudos indicam que muitas ITU recorrentes podem de facto ser recaídas causadas pelo ressurgimento de reservatórios intracelulares bacterianos que podem persistir por muitas semanas a meses dentro do uroepitélio. Estudos epidemiológicos dão crédito a esta possibilidade, demonstrando que bactérias responsáveis por infecções recorrentes são idênticas às que provocaram a infecção inicial em 68% dos casos. À luz destes factos tem sido sugerido que antibióticos mais penetrantes poderiam eliminar melhor os reservatórios bacterianos da bexiga e consequentemente reduzir a incidência da ITU crónica e recorrente^[11].

Algumas abordagens terapêuticas alternativas podem também ser benéficas como tem sido sugerido em estudos recentes que mostram que o consumo a longo prazo de sumo de arando ou extractos de sumo de arando pode reduzir a recorrência de ITU em mulheres jovens e de meia idade em cerca de 35%^[11].

1.1.4. Vias de infecção

O tracto urinário de um adulto saudável é geralmente estéril mas é também o local mais comum de infecção bacteriana. Em geral, as ITU desenvolvem-se de um modo ascendente começando com colonização periuretral, seguida por ascensão pela uretra para a bexiga provocando cistite, e nalguns casos, se deixada por tratar, ascensão pelos ureteres para os rins estabelecendo pielonefrite aguda. A pielonefrite aguda é considerada a ITU mais grave uma vez que pode provocar cicatriz no rim, o que por sua vez pode conduzir a lesão renal irreversível, insuficiência renal e/ou sépsis^[12].

No caso da mulher, pelas suas características anatómicas, a via ascendente tem uma maior importância. Entre os factores que a predispõem, a micção com esvaziamento vesical incompleto é a causa funcional mais importante, conjuntamente com a

diminuição do fluxo urinário e a manipulação mediante catéteres; também intervêm o aumento do pH vaginal e as alterações anátomo-funcionais da bexiga. No homem a hipertrofia prostática é um factor importante^[2].

A colonização vaginal é um pré-requisito para a infecção da bexiga; factores que aumentam o risco de ITU fazem-no em parte por facilitação da colonização vaginal. Alterações na microflora vaginal desempenham um papel crítico na facilitação da colonização vaginal com coliformes e assim a ITU. Em particular, alterações na presença ou concentração de lactobacilos, especialmente estirpes produtoras de peróxido de hidrogénio, desempenham um papel na colonização vaginal com uropatógenos. Geralmente os factores que predispõem para a colonização vaginal também predispõem para a colonização da bexiga e infecção. Contudo, a colonização vaginal com uropatógenos não conduz inevitavelmente a ITU. É provável que a colonização vaginal seja geralmente um predeterminante necessário para a ITU mas é necessário que ocorram outros eventos tais como relações sexuais, para permitir a ocorrência de infecção^[6].

A ITU sintomática desenvolve-se quando os uropatógenos na bexiga ou rim estimulam a libertação de citocinas, provocando uma resposta inflamatória e sintomas^[6]. Em resposta à invasão dos uropatógenos no tracto urinário normalmente estéril, são desencadeadas as respostas inflamatórias do hospedeiro conduzindo à produção de citocinas, influxo de neutrófilos, exfoliação das células epiteliais infectadas da bexiga e a geração de espécies reactivas de azoto e oxigénio juntamente com outros compostos antimicrobianos^[13].

1.1.5. Agentes etiológicos

A maioria das infecções são provocadas por relativamente poucas espécies. Muitos destes organismos podem ser encontrados como parte da flora comensal uretral e fecal. A ITU é comumente provocada pelas bactérias da flora intestinal do próprio que entram no tracto urinário por via ascendente através da uretra^[1].

O espectro de agentes etiológicos é similar na ITU alta e baixa não complicada. Na ITU complicada este espectro é mais amplo do que na ITU não complicada e as bactérias são provavelmente mais resistentes aos antimicrobianos^[5].

Os bacilos Gram negativos provocam a maioria das ITU, especificamente *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entre os cocos Gram positivos, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus* do Grupo B (SGB) são os principais agentes etiológicos^[1].

Em crianças e adultos *E.coli* é o agente etiológico mais comum de ITU o que reflecte não só a sua predominância no intestino mas também factores de virulência específicos como a sua capacidade de aderir às células uroepiteliais. É responsável por até 90% dos casos de ITU não complicada em mulheres jovens, 70% dos casos de ITU

complicada da comunidade e 66% dos casos de ITU complicada ou pielonefrite aguda^[1].

Em estudos efectuados verificou-se que por um lado na ITU aguda por *E.coli*, a estirpe urinária tende a ser a estirpe fecal predominante no hospedeiro mas por outro lado, os isolados da ITU geralmente exibem mais factores de virulência do que os isolados fecais dos hospedeiros saudáveis e derivam predominantemente dos grupos filogenéticos B₂ e D (versus grupos A e B₁ para as estirpes fecais). A estirpe da ITU é geralmente mais virulenta e mais abundante do que as estirpes fecais co-isoladas. Os clones urinários, apesar de quase sempre detectáveis na flora fecal do hospedeiro na altura da apresentação, representam um subconjunto da flora, enriquecido para os traços de virulência tradicionalmente reconhecidos e grupo filogenético B₂^[14].

K.pneumoniae é geralmente o segundo agente etiológico em incidência nos casos comunitários. *P.mirabilis* e *Morganella* spp. estão geralmente associados a pacientes mais velhos e pacientes com cálculos renais. *P.aeruginosa* é mais comumente encontrada na ITU nosocomial do que nos casos adquiridos na comunidade. *S.saprophyticus* é a espécie mais comum de estafilococos coagulase negativo a provocar ITU. *S.saprophyticus* provoca infecção em adolescentes e mulheres adultas jovens que têm a sua primeira ITU. Contudo, é uma causa rara em mulheres mais velhas. Os enterococos são mais frequentes nas ITU complicadas do que nas não complicadas. *Enterococcus* spp. têm sido reportados em cerca de 10% de todas as ITU e até 16% do conjunto nosocomial. Os enterococos podem estar mais vulgarmente associados a pacientes com anomalias estruturais subjacentes ou em pacientes que sofreram manipulações urológicas prévias. *Staphylococcus aureus* é um agente causal de ITU mais raro. O isolamento de SGB da urina pode ser usado para determinar a colonização vaginal da mulher grávida em vez do isolamento por zaragatoas vaginais-rectais. O SGB pode provocar ITU nas mulheres grávidas e na população não grávida, especialmente diabéticos, onde a infecção por SGB é duas a três vezes mais comum do que nos pacientes não diabéticos^[1].

Nas mulheres diabéticas os microrganismos mais comumente encontrados são *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Enterococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae*^[10].

Espécies de *Candida* também estão a ser reconhecidas como agentes de ITU. A detecção de leveduras na urina é rara em indivíduos saudáveis mas é um problema importante em pacientes hospitalizados. *Candida albicans* é a levedura mais frequentemente isolada da urina. Os factores de risco para a candidúria incluem diabetes mellitus, neoplasmas, cateterização urinária, utilização periódica de antibióticos de amplo espectro ou esteróides, procedimentos cirúrgicos no mês precedente, sexo feminino, idade avançada e hospitalização por mais de 7 dias^[1].

1.1.6. Diagnóstico da ITU

A experiência clínica sugere que muitas ITU inferior não complicadas encontradas na comunidade podem ser diagnosticadas clinicamente sem o recurso a uroculturas. Aos pacientes que apresentam sintomas consistentes com cistite ou uretrite deve ser realizado um exame físico e urianálise. A utilização de tiras-teste e/ou urianálise microscópica fornece um diagnóstico que é suficientemente específico e sensível para estabelecer o diagnóstico de ITU não complicada. Contudo, as uroculturas continuam a ser importantes em pacientes com ITU recorrentes ou falha terapêutica. Em virtude do aumento da resistência aos antibióticos dos patógenos urinários, a cultura é necessária para realizar os testes de sensibilidade aos antibióticos^[1].

A utilidade principal da urianálise é examinar e documentar a presença de piúria, hematúria, nitratos, esterase leucocitária e bactérias. A presença de eritrócitos ou leucócitos na urina pode ajudar a diferenciar a localização da infecção. A piúria está presente em quase todos os pacientes com uretrite, cistite e pielonefrite. Alguns autores referem que a presença de mais do que 5 leucócitos/campo tem uma sensibilidade de 85% para a ITU. Outros autores sugerem que 10 leucócitos/campo é um *cutoff* mais fiável para o diagnóstico. A hematúria pode estar presente na cistite e pielonefrite mas é raramente encontrada na uretrite. A análise microscópica pode também revelar a presença de cilindros hemáticos que são indicadores de ITU superior^[1].

As uroculturas permanecem uma pedra fundamental no diagnóstico da ITU. O entendimento da patogénese da ITU foi melhorado pelo conceito de bacteriúria significativa introduzido por Kass e Sanford. Eles mostraram que uma cultura de urina contendo $\geq 10^5$ UFC/ml numa população assintomática podia ser confirmada por uma segunda cultura. Pelo contrário, contagens mais baixas eram só esporadicamente reproduzidas, representando assim contaminação. Mais tarde, estudos mostraram que culturas positivas com contagens $< 10^5$ UFC/ml eram frequentes em pacientes com sintomas de ITU. Idealmente, o limite para bacteriúria significativa define o menor número de bactérias detectadas na urina, definidas por colonização contínua da bexiga e doença^[15].

Níveis superiores a 10^2 UFC/ml mostraram uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 85% para o diagnóstico de cistite na mulher. Pacientes do sexo masculino com crescimentos superiores a 10^3 UFC/ml são considerados positivos para a ITU. Todos os pacientes com pielonefrite têm níveis mais elevados de bacteriúria, com culturas com crescimentos superiores a 10^4 UFC/ml^[1].

A recolha apropriada da amostra urinária têm uma influência importante na utilidade dos resultados da cultura. Mesmo as amostras mais cuidadosamente recolhidas podem ser facilmente contaminadas com a flora perineal, vaginal e periuretral^[1].

A aspiração suprapúbica é considerada o *gold standard* para obter urina da bexiga porque a amostra é a que tem menor probabilidade de estar contaminada. Permanece o método de escolha para o diagnóstico de ITU nos bebés, especialmente naqueles que estão sépticos e requerem terapêutica imediata. Não é utilizado em crianças mais velhas nem em adultos. Nestes um outro método possível para a recolha de urina sem contaminação é a cateterização^[1].

No entanto o método mais utilizado é a recolha por jacto médio porque é não invasivo e evita os riscos inerentes à cateterização. Estas amostras são as mais facilmente contaminadas com a flora perineal, vaginal e uretral. Devem ser fornecidas instruções aos pacientes de modo a reduzir as potenciais contaminações. Após limpeza adequada da zona urogenital, os primeiros mililitros de urina são rejeitados para eliminar as bactérias da uretra. Sem parar o fluxo deve então ser recolhida a porção média da urina para um contentor de boca larga esterilizado^[1].

A urina deve ser processada o mais próximo possível da altura da colheita para minimizar as hipóteses de aumento da contagem de colónias de quaisquer patógenos e contaminantes presentes. Se não é possível transportar a urina ao laboratório em 2 horas, a urina deve ser refrigerada ou preservada durante o transporte^[1].

As culturas de urina devem ser processadas em gelose de sangue e um meio selectivo para Gram negativos. Estão também disponíveis vários meios cromogénicos. Nos meios cromogénicos como o CPS ID3 (bioMérieux) organismos específicos vão produzir colónias coloridas dependendo das enzimas que produzem e substratos incorporados no meio. A principal vantagem destes meios é a capacidade de detectar rapidamente culturas mistas e reduzir o número de identificações que necessitam ser realizadas. As placas devem ser incubadas a 35-37°C *overnight* (mínimo de 16 h)^[1].

1.1.7. Tratamento da ITU

Estudos sugerem que deve ser iniciada terapêutica antibiótica para qualquer paciente com sintomas de ITU e culturas positivas para uropatógenos com contagens iguais ou superiores a 10^3 UFC/ml. Para *S.saprophyticus*, contagens mais baixas podem ser significativas^[1].

Se os sintomas não se resolverem ou recorrerem deve ser realizada uma nova cultura. São recomendadas culturas de seguimento 1-2 semanas após terminar o tratamento para detectar recaídas em mulheres grávidas e pacientes com risco elevado para lesão renal, mesmo se os pacientes forem assintomáticos^[1].

A terapêutica antibiótica encurta a duração dos sintomas e cura provavelmente mais de 90% das infecções^[9].

Após início do tratamento com um agente antimicrobiano ao qual o agente é sensível, as bactérias são eliminadas da urina em 48h em quase todos os pacientes com ITU não complicada^[1].

A escolha da terapêutica antibiótica empírica deve ser guiada por^[5]:

- espectro e padrões de susceptibilidade dos uropatógenos
- eficácia para uma indicação particular em estudos clínicos
- tolerabilidade
- efeitos adversos
- custo
- disponibilidade

Na Europa, de acordo com estes princípios e padrões de susceptibilidade, a fosfomicina trometamol, pivmecilinam e nitrofurantoína são considerados fármacos de primeira escolha em muitos países, quando disponíveis. O cotrimoxazol ou trimetoprim só deve ser considerado como primeira escolha em áreas com taxas de resistência conhecidas de *E.coli* inferiores a 20%.

TABELA 1: TERAPÊUTICA ANTIMICROBIANA EMPÍRICA RECOMENDADA NA CISTITE AGUDA NÃO COMPLICADA NA MULHER SAUDÁVEL PRÉ-MENOPÁUSICA (ADAPTADO DE ^[5])		
Antibiótico	Dose diária	Duração da terapêutica
Fosfomicina trometamol	3 g dose única	1 dia
Nitrofurantoína	50 mg 6h/6h	7 dias
Macrocristais de Nitrofurantoína	100 mg 12h/12h	5-7 dias
Pivmecilinam	400 mg 12h/12h	3 dias
Pivmecilinam	200 mg 12h/12h	7 dias
Alternativas		
Ciprofloxacina	250 mg 12h/12h	3 dias
Levofloxacina	250 mg 12h/12h	3 dias
Norfloxacina	400 mg 12h/12h	3 dias
Ofloxacina	200 mg 12h/12h	3 dias
Cefpodoxima proxetil	100 mg 12h/12h	3 dias
Se o padrão de resistência local for conhecido (resistência de <i>E.coli</i> < 20%)		
Trimetoprim-sulfametoxazol	160/800 mg 12h/12h	3 dias
Trimetoprim	200 mg 12h/12h	5 dias

Na gravidez a bacteriúria assintomática detectada deve ser erradicada com antibióticos. Os regimes recomendados são os seguintes:

TABELA 2 - REGIMES DE TRATAMENTO PARA A BACTERIÚRIA ASSINTOMÁTICA E CISTITE NA GRAVIDEZ (ADAPTADO DE ^[5])

Antibiótico	Duração da terapêutica	Comentários
Nitrofurantoína 100 mg	12h/12h, 3-5 dias	Evitar na deficiência em G-6-fosfato desidrogenase
Amoxicilina 500 mg	8h/8h, 3-5 dias	Aumento da resistência
Amoxicilina/ácido clavulânico 500mg	12h/12h, 3-5 dias	
Cefalexina 500 mg	8h/8h, 3-5 dias	3 dias
Fosfomicina 3g	Dose única	
Trimetoprim-sulfametoxazol	12h/12h, 3-5 dias	Evitar trimetoprim no 1º trimestre/termo e sulfametoxazol no 3º trimestre/termo

1.2. Factores de virulência

A gravidade da ITU depende da virulência da bactéria e da susceptibilidade do hospedeiro^[16].

A virulência bacteriana para o tracto urinário é multifactorial. Os microrganismos expressam diferentes factores de virulência que actuam em conjunto e estes factores podem ser modulados pela resposta do hospedeiro^[15]. Os factores de virulência são determinantes genéticos da patogenicidade microbiana, eles aumentam a aptidão do patógeno durante a infecção^[17].

1.2.1. Factores de virulência de *E.coli*

Os isolados de *E.coli* uropatogénica (UPEC) são um grupo geneticamente heterogéneo que exhibe vários factores de virulência associados com colonização e persistência das bactérias no tracto urinário^[4].

As estirpes UPEC possuem *clusters* genéticos, que codificam para diferentes adesinas e outros factores de virulência, nos ilhéus de patogenicidade. A expressão destes factores está por vezes ligada e co-regulada, e a regulação é sensível a sinais ambientais^[15].

A UPEC possui numerosos factores de virulência incluindo α -hemolisina, factor de necrose citotóxico, adesinas e sistemas de aquisição do ferro. Estes factores suportam a sua capacidade de aderir às células uroepiteliais, ajudam a resistir ao efeito bactericida do soro e aumentam a hidrofobicidade da superfície celular conduzindo ultimamente a lesão tecidual^[16].

Outras estruturas de superfície que são características das estirpes UPEC incluem os flagelos, a cápsula polissacarídica que é anti-fagocítica e desempenha um papel na resistência ao soro; o lipopolissacárido (LPS), que medeia os efeitos da endotoxina,

liberta citocinas e também participa na resistência ao soro e outras proteínas de membrana^[8]. Alguns dos factores de virulência da UPEC estão descritos nas tabelas 3 e 4.

Um outro gene que codifica para um novo factor de virulência foi descoberto mais recentemente. Este gene codifica a proteína designada Usp (*uropathogenic-specific protein*) e potencia significativamente a infectividade de *E.coli* no modelo murino de ITU^[4]

TABELA 3 - FACTORES DE VIRULÊNCIA NA *E.COLI* UROPATOGÉNICA: ESTRUTURAS DE SUPERFÍCIE. (ADAPTADO DE ^[8])

Factor de virulência	Função
Fímbrias tipo 1	Adesão (epitélio, matriz), invasão, biofilme
Fímbrias P	Adesão (epitélio, matriz), secreção de citocinas
Fímbrias S	Adesão (epitélio, endotélio, matriz)
Fímbrias F1C	Adesão (epitélio, endotélio)
Curli	Adesão (epitélio, matriz), biofilme
Flagelo	Mobilidade, <i>fitness</i>
Cápsula	Anti-fagocítica, anti-complemento, resistência ao soro
LPS	Efeitos endotoxina, citocinas, resistência ao soro
OPMS	Receptor, transporte

TABELA 4 - FACTORES DE VIRULÊNCIA NA *E.COLI* UROPATOGÉNICA: FACTORES EXPORTADOS. (ADAPTADO DE ^[8])

Factor de virulência	Função
α-hemolisina	Citotoxicidade, hemolisina
CNF-1	Interferência com a fagocitose
SAT-1	Citotoxicidade
Enterobactina	Sideróforo
Aerobactina	Sideróforo
Yersiniabactina	Sideróforo

Estudos epidemiológicos mostram que a adesão bacteriana às superfícies mucosas é um factor crítico de virulência para a ITU^[18]. A adesão à mucosa do tracto urinário pode proteger a bactéria do fluxo urinário e por outro lado aumentar a sua capacidade de sobreviver e invadir o tecido renal. A adesão específica é mediada por certas adesinas que podem ser diferenciadas com base na sua especificidade de ligação ao receptor^[16].

Na actualidade, a presença ou ausência de fímbrias/adensinas e o tipo a que pertencem, considera-se o factor crucial inicial do desenvolvimento da ITU. São comuns na maioria das bactérias de Gram negativo e em particular em *E.coli*^[2].

As estirpes virulentas de UPEC que provocam cistite tipicamente produzem, pelo menos um sistema de adesão. As adensinas contribuem para a virulência, promovem a colonização, invasão e replicação dentro das células uroepiteliais^[4].

Foram reconhecidos cinco tipos de fímbrias na UPEC, mas dois dos mais importantes são as fímbrias do tipo 1 (ou manose sensíveis), e as do tipo P (ou manose resistentes)^[8], que se caracterizam pela sua capacidade de aglutinar hemácias, em presença ou ausência da manose^[2]. Estes apêndices possibilitam a adesão da *E.coli* ao uroepitélio e à matriz através da mediação da ligação a receptores ou epítomos dos receptores presentes no uroepitélio^[18].

As fímbrias do tipo 1 associam-se a infecções do tracto urinário inferior (cistite) e as do tipo P às do superior (pielonefrite). A *E.coli* pode conter vários tipos de fímbrias e sofrer o fenómeno conhecido como variação de fase, que se manifesta por uma alteração na expressão das fímbrias^[2].

1.2.1.1. Fímbrias tipo 1

As fímbrias do tipo 1 são codificadas pelo operão *fim* e possuem várias adensinas, codificadas pelo gene *fimH*^[18]. As fímbrias tipo 1 são fibras adesivas consistindo em pílus cilíndricos compostos de subunidades de pilina FimA e pequenas fibrilhas compostas de FimF, FimG e a adensina FimH. A adensina FimH reconhece uroplaquinas manosiladas e receptores integrina β -1 e α -3 na superfície luminal das células uroepiteliais da bexiga. A ligação da UPEC às células hospedeiras induz uma cascata de eventos de sinalização que conduz à internalização bacteriana e à formação de comunidades bacterianas intracelulares (IBC). A formação de IBC é também dependente das fímbrias tipo 1. A *fimH* é necessária para a invasão das células epiteliais superficiais da bexiga. Após invasão, as células epiteliais são capazes de expelir UPEC, possivelmente como um mecanismo inato de defesa. Finalmente as bactérias dispersam deste nicho intracelular e progridem para infectar outras células uroepiteliais^[17, 19].

Em modelos animais a neutralização da adensina por anticorpos específicos da FimH protege da cistite por UPEC^[19].

1.2.1.2. Fímbrias P

A adensina mais estudada e também o primeiro factor associado à virulência para a UPEC é a fímbria P.^[12] As fímbrias P (associadas a pielonefrite) são codificadas pelo operão *pap*. A adensina localizada na extremidade da fímbria é codificada pelo gene *papG*.^[18] As fímbrias P são significativamente prevalentes entre estirpes de UPEC que provocam pielonefrite e são caracterizadas pela sua adesão manose-resistente aos

resíduos Gal(α 1-4)Gal β presentes nos glicolípidos de membrana dos eritrócitos humanos do grupo sanguíneo P e nas células uroepiteliais^[12].

Estruturalmente, são compostas por cerca de 1000 cópias da principal subunidade proteica, PapA, que polimeriza para formar um caule rígido que é ligado a uma extremidade flexível consistindo em cópias limitadas das subunidades proteicas menores PapE e PapF e adesina de ligação ao receptor, PapG na extremidade distal^[12].

Clinicamente o alelo de classe II *papG* está primariamente associado com a pielonefrite humana e bacterémia e o alelo *papG* de classe III está associado com a cistite humana e com infecção genito-urinária em cães e gatos. Existe expressão *in vivo* de fímbrias P durante a ITU humana^[12].

Parece que existe um papel subtil para as fímbrias P na mediação da adesão às células uroepiteliais *in vivo* e estabelecimento de uma resposta inflamatória robusta durante a colonização renal, que por seu lado contribui para a lesão renal durante a pielonefrite aguda^[12].

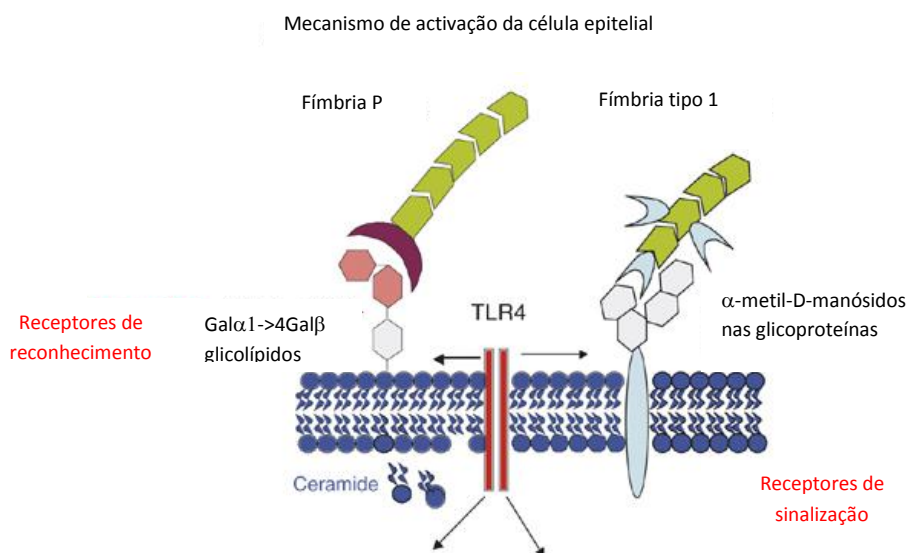


Figura 1 – Representação esquemática das fímbrias tipo 1 e P. A *E.coli* uropatogénica possui um arsenal de factores de virulência e provoca infecções graves como pielonefrite. A *E.coli* com fímbrias P adere ao epítipo do receptor Gal α 1->4Gal β do uroepitélio e activa as células epiteliais através do receptor TLR 4. As fímbrias do tipo 1 reconhecem os resíduos ligados a manose num conjunto de glicoproteínas. Adaptado de ^[20]

1.2.1.3. Pílus ECP

A maior parte das estirpes patogénicas de *E.coli* bem como estirpes comensais produzem a 37°C uma estrutura fimbrial adesiva composta por uma subunidade proteica pilina de 21 kDa correspondente ao produto do gene *yagZ*. Uma vez que este gene está distribuído globalmente e altamente conservado entre estirpes de *E.coli* e porque a produção do pílus foi demonstrada nas principais estirpes patogénicas de *E.coli* foi proposto que fosse renomeado de “*E.coli common pilus*” ou ECP e que o gene que codifica a subunidade pilina fosse designado *ecpA*. Foi demonstrado um papel do

ECP na adesão a células epiteliais humanas cultivadas na *E.coli* enterohemorrágica O157:H7 e em estirpes comensais de *E.coli*^[21, 22].

O ECP é um atributo comum de *E.coli* que foi herdado e conservado durante a evolução das *E.coli* intestinais e extra-intestinais, fornecendo um mecanismo de disseminação da colonização em diferentes hospedeiros e tecidos^[22].

A elevada percentagem de estirpes de *E.coli* que produzem ECP é uma indicação que os pílus desempenham um papel biológico significativo na interacção hospedeiro-bactéria^[22].

O pílus ECP caracteriza-se por ser essencial para a virulência de estirpes enteropatogénicas. Medeia a ligação de microrganismos comensais e patogénicos aos enterócitos. Tendo em conta que o tracto gastrointestinal é uma fonte primária de estirpes de *E.coli* responsável por infecções urinárias, o pílus ECP pode ter um papel fulcral não só na invasão do epitélio vesical, mas também na manutenção destas estirpes na mucosa intestinal permitindo a sua evasão ao sistema imunitário^[23].

1.2.2. Factores de virulência de *K.pneumoniae*

Têm sido propostos uma variedade de factores como possíveis determinantes de virulência em *K.pneumoniae*. A produção de polissacárido capsular confere propriedades bactericidas e antifagocíticas. A colonização do epitélio dos tractos respiratório e urinário é iniciada por proteínas fimbriais ou adesinas não fimbriais. Componentes envolvidos na adesão intestinal também são importantes factores de virulência. A produção e utilização de aerobactina também aumenta a virulência e um complexo tóxico secretado por *K.pneumoniae* é letal nos ratinhos. Várias toxinas detectadas em *K.pneumoniae* também têm sido implicadas em infecções provocadas por esta bactéria^[24].

1.2.2.1. Hemolisina KHE

As hemolisinas são funcionalmente definidas pela sua capacidade de lisar eritrócitos e têm sido associadas com virulência numa variedade de microrganismos. A hemolisina de *K.pneumoniae* exibe efeito hemolítico em eritrócitos de ovelha, de rato e humanos. Num estudo efectuado por Yin-Ching *et al.* o gene *khe* estava presente em todos os isolados clínicos de *K.pneumoniae* testados mas ausentes noutras bactérias. O gene *khe* é único no genoma de *K.pneumoniae*, não estando presente noutras espécies de *Klebsiella*^[24].

1.2.2.2. Fímbrias tipo 1

Os genes de *K.pneumoniae* codificam numerosas fímbrias, incluindo fímbrias do tipo 1 e tipo 3. As fímbrias tipo 1 têm sido historicamente definidas pelo seu fenótipo sensível à manose^[19].

As fímbrias do tipo 1 em *K.pneumoniae* são um factor de virulência importante para a ITU^[25].

As fímbrias tipo 1 de *K.pneumoniae* são altamente homólogas às da UPEC e foram implicadas na patogénese da ITU. O operão *fim* de *K.pneumoniae*, que codifica para as fímbrias tipo 1, contém um gene *fimK* terminal, não presente na UPEC, que desempenha um papel na supressão da expressão de fímbrias tipo 1. A *K.pneumoniae* liga-se, invade e forma IBC dentro das células uroepiteliais do hospedeiro se bem que menos eficientemente do que a UPEC no modelo de cistite murino. Similarmente à UPEC, *K.pneumoniae* também expressa fímbrias tipo 1 dentro destes IBC^[19].

Variações limitadas na sequência entre a FimH de *E.coli* e de *K.pneumoniae* resultam em diferenças na função e capacidade de colonizar o tracto urinário. Apesar das suas fracas propriedades adesivas, a FimH de *K.pneumoniae* permanece um importante factor de virulência. Possibilita à *K.pneumoniae* progredir através de uma via IBC durante a ITU e persistir no hospedeiro^[19].

1.2.2.3. Fímbrias tipo 3

As fímbrias do tipo 3 são produzidas por muitos membros das *Enterobacteriaceae*, incluindo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Serratia*. Este tipo de fímbria é detectado por aglutinação, *in vitro*, de eritrócitos tratados com ácido tânico, e a hemaglutinação pode ocorrer na presença ou ausência de D-manose. Este fenómeno de adesão é conhecido como hemaglutinação manose resistente. A actividade de hemaglutinação é mediada pela adesina polipeptídica MrkD do *cluster* de genes das fímbrias do tipo 3. A adesina facilita a ligação às membranas basais dos tecidos humanos^[26].

Vários estudos demonstraram claramente um papel para as fímbrias do tipo 3 na formação de biofilmes. As fímbrias do tipo 3 também medeiam várias funções de adesão como a ligação a células epiteliais (dos tractos respiratórios e urinários) e proteínas da matriz extracelular^[27].

A expressão das fímbrias do tipo 3 em *Klebsiella* requer a presença de pelo menos seis genes *mrk* (A,B,C,D,E,F). O gene *mrkD* que codifica as adesinas fimbriais é distinto do que codifica a principal subunidade fimbrial (*mrkA*)^[26]. Os genes *mrk* residem em múltiplas localizações genéticas, incluindo o cromossoma, plasmídeos conjugativos e transposões compostos^[27].

A adesina MrkD media vários fenótipos, incluindo aglutinação manose resistente, adesão a células endoteliais humanas, células da bexiga, membranas basais e proteínas da matriz extracelular como o colagénio IV e V. Estudos anteriores demonstraram que variações na sequência da adesina MrkD estão associadas com diferentes propriedades de ligação^[26, 27].

1.3. Resistência aos antibióticos

A descoberta e produção de antibióticos (sintéticos) na primeira metade do século 20 foi um dos maiores feitos da medicina. A utilização de agentes antimicrobianos reduziu a morbidade e mortalidade nos humanos e contribuiu substancialmente para o aumento da esperança de vida^[28].

Em 1929 Fleming descobriu o primeiro composto antimicrobiano, a penicilina, um antibiótico β -lactâmico. Hoje em dia existem numerosas classes de antibióticos, classificadas com base no seu mecanismo de acção. Os antibióticos podem inibir a síntese proteica (aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrólidos, estreptomicina e tetraciclina), interagir com a síntese do DNA e RNA (quinolonas e rifampicina), inibir a síntese ou lesar a parede bacteriana (β -lactâmicos e glicopéptidos) ou modificar o metabolismo energético da célula microbiana (sulfonamidas e trimetoprim)^[28].

A resistência aos antibióticos é uma preocupação^[29]. Nos últimos anos detectou-se em vários países europeus variações significativas na sensibilidade microbiana a vários antibióticos, observando-se o aparecimento progressivo de resistência para as fluoroquinolonas e outros antibióticos comumente utilizados no tratamento empírico da ITU da comunidade^[30]. *E.coli*, o patógeno mais prevalente do tracto urinário, tem mostrado resistência elevada aos antibióticos utilizados comumente, como amoxicilina e trimetoprim-sulfametoxazol^[29]. O aparecimento de resistências está-se a converter num problema de saúde de difícil manejo, o que sugere que se devem rever as normas de tratamento de primeira e segunda linha de modo a fazer um uso mais racional de antibióticos^[30].

É bem conhecido que ocorrem variações nos padrões de resistência bacteriana de *E.coli* em diferentes populações^[31]. Para tratar efectivamente os doentes com ITU é importante o conhecimento da epidemiologia bacteriana local e do seu padrão de resistência^[29]. É imprescindível que os clínicos estejam constantemente actualizados acerca dos perfis de resistência locais de modo a actualizarem os regimes empíricos de terapêutica antimicrobiana^[29, 31].

As bactérias tornaram-se resistentes aos antimicrobianos através de vários mecanismos^[28]:

- alterações de permeabilidade da parede celular bacteriana o que restringe o acesso dos antimicrobianos aos locais alvo
- efluxo activo do antibiótico da célula microbiana
- modificação enzimática do antibiótico
- degradação do agente antimicrobiano
- aquisição de vias metabólicas alternativas àquelas inibidas pelo fármaco
- modificação dos alvos do antibiótico
- superprodução da enzima alvo

Uma vez que um número cada vez mais elevado de isolados bacterianos demonstram resistência a um amplo espectro de agentes antimicrobianos tanto a nível hospitalar como a nível da comunidade, a rápida disseminação de bactérias resistentes e de genes de resistência a antimicrobianos é um problema alarmante, complicando o tratamento das infecções. Parte do problema é o resultado da transferência de genes de resistência aos antibióticos entre diferentes espécies bacterianas, veiculados por plasmídeos e transposões. Nos últimos anos foi descoberto um terceiro mecanismo para a disseminação de genes de resistência – os integrões^[32, 33].

1.3.1. Integrões

Os integrões são elementos genéticos que foram descobertos no início dos anos 80. Caracterizam-se por serem capazes de captar genes que codificam determinantes de resistência a antibióticos e determinantes com outras funções. Os integrões disseminaram-se amplamente entre as espécies da família *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram negativas (*Vibrio cholera* e *P.aeruginosa*). Os genes (exógenos) que se incorporam nos integrões apresentam uma estrutura particular e denominam-se cassetes de genes. A integração produz-se por um mecanismo de recombinação específica de local^[34].

Os integrões na sua forma mais simples são formados por 3 elementos necessários para a captura e expressão de genes exógenos (cassetes): um que codifica uma integrase (*intI*), um que é o local de recombinação específico (*attI*) e por último, um promotor (P_{ant}) para a expressão dos genes integrados. Por vezes podem conter um promotor mais forte, P2, localizado a 3' do primeiro. O local de recombinação específico *attI* é formado por 65 pares de bases, incluindo 2 regiões correspondentes aos locais de união forte e fraca da integrase e um local de recombinação no qual os genes capturados são integrados graças à acção da integrase *IntI*. No total, um integrão com estes elementos únicos e sem cassetes de genes incorporadas possui um tamanho aproximado de 1,1 kb^[28, 33, 34].

Os genes *intI* têm sido usados como base para o agrupamento de integrões em classes. Correntemente existem quatro classes: aquelas que possuem o gene *intI1* são definidas como classe 1, *intI2* como classe 2, *intI3* como classe 3 e *intI4* como classe 4^[28, 35].

As cassetes de genes podem aparecer como moléculas de DNA não replicativas circulares mas por norma encontram-se nos integrões como sequências lineares. As cassetes geralmente incluem um único gene e na posição 3' apresentam uma sequência de recombinação específica de local, conhecida como *attC*, ou também conhecida como elemento de 59 bases, através da qual se efectua o seu reconhecimento e mobilização^[34].

As cassetes são mobilizadas pela integrase que reconhece o local *attC* da cassette e o local receptor *attI* do integrão, permitindo tanto a sua integração como a sua excisão. A integrase de classe 1 (Int1), além de catalisar a reacção de integração ou excisão entre *attI* e *attC* pode catalisar ocasionalmente processos de recombinação tanto de integração como de excisão entre dois *attC*. A inserção e/ou excisão das cassetes dentro do integrão desempenha uma função importante na incorporação e formação de novas combinações de genes de resistência aos antimicrobianos. Muitos integrões possuem mais de uma cassette de genes de resistência^[34].

Os integrões de classe 1 são os que se encontram com maior frequência nas estirpes isoladas de casos clínicos. Caracterizam-se por terem a sequência 5' conservada (5'CS) que contém o gene codificante da integrase e a maioria deles contém também uma sequência 3' conservada (3'CS) que contém um gene que confere resistência a compostos de amónio quaternário (*qacE1*) e um gene de resistência a sulfonamidas (*sul1*). Estes dois genes de resistência não são cassetes mas encontram-se fixos no integrão. Na figura 2 encontra-se a representação esquemática de um integrão^[34].

Os integrões de classe 1 encontram-se disseminados nos isolados clínicos. A sua localização em plasmídeos pode contribuir para a disseminação horizontal das cassetes de genes de resistência aos antibióticos^[33]

A prevalência de integrões de classe 1 em isolados clínicos de Gram negativos é cerca de 43% na Europa Central e Ocidental, superior a 50% na Holanda e 59% na França^[33].

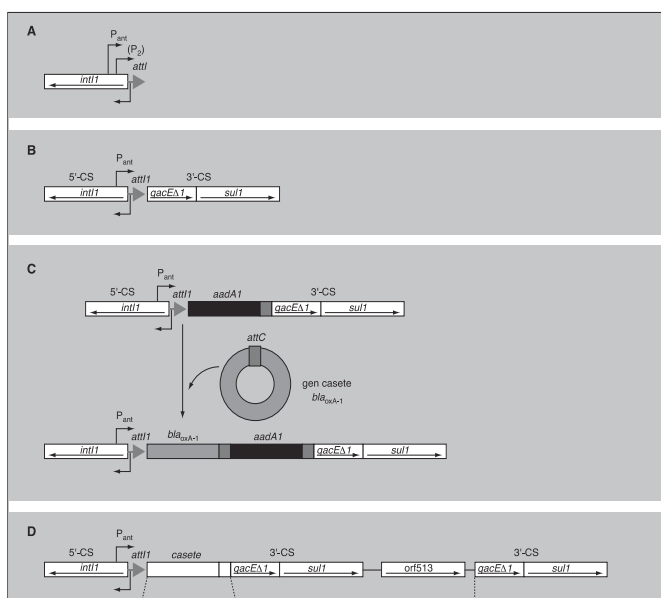


Figura 2.-Estrutura de um Integrão

A) Representação esquemática da estrutura comum a todos os integrões, caracterizada pelo gene codificante da integrase (*intI1*), o local de recombinação específico (*attI*) e um promotor (P_{int}) que permite a expressão das cassetes de genes inseridas na *attI* do integrão. Às vezes há um promotor mais forte, P_2 . **B)** Integrão de classe 1 com a estrutura comum a todos os integrões em posição 5' (5'-CS) e a sequência conservada 3'-CS característica desta classe de integrões que inclui os genes de resistência a compostos de amónio quaternário (*qacE1*) e a sulfamidas (*sul1*). **C)** Integrão de classe 1 com uma cassette de genes que codifica uma aminoglicosídeo-adeniltransferase (*aadA1*). Mostra-se a integração de uma nova cassette codificante de uma β -lactamase (*bla_{OXA-1}*) observando-se como a integração desta desloca a cassette anterior (*aadA1*) em direcção a 3'. **D)** Representação esquemática da estrutura de um integrão composto caracterizado pela repetição de duas sequências conservadas 3'-CS. *qacE1*: compostos de amónio quaternário; *sul1*: sulfonamidas. Adaptado de ^[34].

A disseminação de genes de resistência aos antibióticos por transferência horizontal conduziu à rápida emergência de resistência antibiótica entre os isolados clínicos das bactérias. A disseminação de genes de resistência é aumentada quando eles formam parte de uma cassette de genes móvel, uma vez que isto contribui para a transferência horizontal por vários mecanismos: (1) mobilização de cassetes individuais pela

integrase codificada nos integrões, (2) movimento quando o integrão que contem a cassette muda de lugar – provavelmente por transposição (3) disseminação para transposões maiores que transportam integrões e (4) movimento de plasmídeos conjugativos contendo integrões entre diferentes espécies bacterianas. Não é portanto surpreendente que muitos dos genes de resistência aos antibióticos encontrados em microrganismos de Gram negativo isolados clinicamente façam parte de uma cassette de genes inserida num integrão^[35].

As viagens internacionais podem contribuir para a sua disseminação e da das suas estirpes hospedeiras. As mesmas cassetes podem disseminar-se em diferentes espécies bacterianas, e diferentes hospedeiros, animais ou humanos, e em diferentes áreas do mundo. Tais observações sublinham a preocupação de que os ecossistemas humanos, animal e microbiano ambiental estão inextricavelmente interligados com a resistência aos antibióticos atravessando facilmente as fronteiras/limites ecológicos e espalhando-se livremente. Isto torna o controlo muito mais difícil^[33].

Estão a ser continuamente descobertas novas cassetes e até agora já foram identificadas mais de 60 cassetes que conferem resistência a um grande número de agentes antimicrobianos^[35].

Os integrões foram significativamente associados com a resistência a certos antibióticos tais como gentamicina, kanamicina, estreptomina, tobramicina, trimetoprim, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina^[35].

Os integrões estão fortemente associados com estirpes com resistência múltipla a antibióticos^[35]. Os isolados clínicos integrão positivos tendem a ter maior resistência a antibióticos o que os isolados integrão negativos^[32].

Alguns investigadores propuseram que o gene *aadA*, que confere resistência à espectinomicina e estreptomina, possa ser a primeira cassette adquirida pelos integrões^[33]. Além do *aadA*, outras cassetes frequentemente encontradas foram aquelas que codificam a resistência ao trimetoprim (*dfr*). O uso de cotrimoxazol para tratar infecções urinárias pode exercer pressão selectiva que pode favorecer a aquisição e manutenção de uma cassette de resistência ao trimetoprim pelos integrões de classe 1^[33].

1.3.2. Antibióticos β -lactâmicos

Ao longo dos últimos 30 anos foram desenvolvidos muitos novos antibióticos β -lactâmicos. Por definição, todos os antibióticos β -lactâmicos possuem um anel β -lactâmico na sua estrutura molecular. A família dos β -lactâmicos inclui penicilinas e derivados, cefalosporinas, carbapenemos, monobactamos e inibidores dos β -lactâmicos^[28].

As cefalosporinas podem ser agrupadas em cefalosporinas de primeira, segunda, terceira ou quarta geração de acordo com a altura em que foram introduzidas e com o

seu espectro de actividade. As cefalosporinas de 1ª geração têm uma boa actividade contra os Gram positivos e uma cobertura modesta para os Gram negativos; as cefalosporinas de 2ª geração têm um aumento da actividade contra Gram negativos e menor actividade contra os Gram positivos; as cefalosporinas de 3ª geração melhoraram a actividade contra os Gram negativos e têm actividade variável contra os Gram positivos; as cefalosporinas de 4ª geração têm uma boa actividade de largo espectro contra os Gram negativos e os Gram positivos. As cefamicinas são por vezes agrupadas dentro das cefalosporinas^[28].

Os carbapenemos difundem-se facilmente nas bactérias e são considerados antibióticos β -lactâmicos de largo espectro. O imipenem e meropenem são representantes desta classe. Apesar dos monobactams não possuírem um núcleo com um anel fundido ligado, pertencem na mesma ao grupo dos β -lactâmicos. Os inibidores da β -lactamase, tais como o ácido clavulânico, contêm um anel β -lactâmico mas possuem actividade antimicrobiana negligenciável e são usados em combinação com os antibióticos β -lactâmicos para ultrapassar a resistência nas bactérias que secretam β -lactamases que inactivam a maioria das penicilinas^[28].

Os antibióticos β -lactâmicos actuam por inibição da síntese da parede celular por ligação às PBPs (proteínas de ligação à penicilina) nas bactérias e interferência com o *cross-linking* estrutural do peptidoglicano, impedindo assim a transpeptidação terminal da parede celular bacteriana. Como consequência enfraquecem a parede celular da bactéria o que provoca a citólise e morte devido à pressão osmótica^[28].

Existem vários mecanismos de resistência antimicrobiana aos antibióticos β -lactâmicos. O mecanismo mais comum e mais importante é a expressão de β -lactamases, por exemplo β -lactamases de espectro alargado (ESBL), enzimas AmpC plasmídicas e β -lactamases que hidrolisam os carbapenemos (carbapenemases)^[28].

A primeira enzima bacteriana descrita que destruía a penicilina foi a β -lactamase AmpC de *E.coli*. A primeira β -lactamase plasmídica, TEM-1, foi descrita em 1960 nos Gram negativos. Hoje em dia existem mais de 1500 β -lactamases localizadas no cromossoma, em plasmídeos ou em transposões^[28].

Com base na sua capacidade para hidrolisar um pequeno número ou uma variedade de β -lactâmicos, as enzimas podem ser subdivididas em β -lactamases de espectro estreito, moderado, amplo ou alargado (ESBL). As β -lactamases de amplo espectro são capazes de fornecer resistência às penicilinas e cefalosporinas e não são inibidas por inibidores como o ácido clavulânico ou tazobactam. As ESBL conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª geração e Aztreonam mas não aos carbapenemos e são inibidas pelos inibidores das β -lactamases^[28].

Com o tempo, as enzimas iniciais TEM-1, TEM-2 e SHV-1 sofreram substituições de aminoácidos (mutações pontuais) evoluindo para as ESBL, começando com TEM-3 e

SHV-2. Mutações adicionais em aminoácidos críticos importantes para a catálise resultaram em mais de 140 variantes conhecidas de variantes de ESBL SHV e TEM^[28].

Em *E.coli*, a resistência aos antibióticos β -lactâmicos até à década de 90 era conferida essencialmente por β -lactamases de espectro alargado (ESBL) do tipo TEM ou SHV, também denominadas ceftazidimases, codificadas em plasmídeos. Estas enzimas hidrolisam penicilinas e cefalosporinas, com maior actividade hidrolítica para a ceftazidima (entre as cefalosporinas de largo espectro) e são inibidas pelo ácido clavulânico^[23].

As β -lactamases SHV são constitutivas da maioria das estirpes de *K.pneumoniae*. O gene *bla*_{SHV-1} cromossomal codifica a resistência à amoxicilina e pensa-se ser ubiqüitário em *K.pneumoniae*. Estes genes, quando associados a β -lactamases veiculadas por plasmídeos, aumentam a possibilidade de desenvolvimento de um fenótipo ESBL. A co-expressão de enzimas SHV e ESBL das famílias TEM, CTX-M ou outras SHV é comum^[36].

As enzimas do tipo CTX-M surgiram no início dos anos 90, na África do Sul, presumivelmente adquiridas através da transferência de elementos genéticos móveis de bactérias ambientais. Este tipo de enzimas, ao contrário das SHV e TEM, são consideradas cefotaximases pois têm uma maior actividade hidrolítica para a cefotaxima do que para a ceftazidima (cerca de 35 vezes superior). No entanto, novas variantes com elevada actividade para ambos os antibióticos já existem, como, por exemplo, CTX-M-15^[23]. Na última década as enzimas CTX-M tornaram-se as ESBL mais prevalentes tanto em meio hospitalar como na comunidade^[23, 28]. A emergência rápida e disseminação global desta família mediada por plasmídeos está associada a elementos móveis e particularmente a sequências de inserção. A elevada mobilidade associada com políticas antibióticas ineficazes tem conduzido a infecções adquiridas na comunidade e nosocomiais^[37].

Em Portugal, a prevalência de *E.coli* produtora de β -lactamases tem vindo a aumentar, com predominância das enzimas tipo CTX-M a causar infecções do tracto urinário tanto em meio hospitalar como na comunidade^[23].

A CTX-M-15 parece ter a maior capacidade de disseminação de toda a família CTX-M. O gene foi detectado na Europa, África, América do Norte e do Sul e Ásia e tem sido associado com muitos surtos comunitários e hospitalares^[37].

Muitas estirpes que expressam β -lactamases CTX-M são multirresistentes. Têm sido encontrados genes que conferem resistência a aminoglicosídeos e tetraciclina e outros genes *bla* nos mesmos plasmídeos que os genes *bla*_{CTX-M}^[37].

1.3.3. Quinolonas

Em 1962, durante o processo de síntese e purificação da cloroquina (um agente antimalárico), foi descoberto o ácido nalidíxico, um derivado das quinolonas, que

possuía actividade bactericida contra os Gram negativos. As quinolonas de segunda geração surgiram quando se tornou claro que a adição de um átomo de flúor na posição 6 da molécula de quinolona, criando uma fluoroquinolona, aumentava grandemente a sua actividade biológica. Durante os anos 80 foram desenvolvidas várias fluoroquinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina. Estas quinolonas demonstraram um espectro alargado de actividade antimicrobiana, incluindo alguns Gram positivos. Nos anos 90, mais alterações resultaram nas fluoroquinolonas de terceira geração, levofloxacina e sparfloxacina, mostrando actividade potente contra Gram negativos e Gram positivos^[28].

As quinolonas inibem a acção da DNA girase e topoisomerase IV, duas enzimas essenciais para a replicação do DNA bacteriano e como resultado os microorganismos morrem^[28]. Estas enzimas regulam as alterações conformacionais na topologia do DNA catalisando a quebra e junção das cadeias de DNA durante o crescimento celular. A principal função da DNA girase é catalisar o superenrolamento negativo ATP dependente do DNA, uma propriedade única desta enzima que é necessária para o início da síntese do DNA. O principal papel da topoisomerase IV é decatenar os replicões filhos^[38]. A DNA girase é uma enzima tetramérica composta por 2 subunidades GyrA e 2 subunidades GyrB. A topoisomerase IV tem uma estrutura similar, com 2 subunidades A e 2 subunidades B. Os quatro genes que codificam para estas enzimas são os alvos para as mutações de resistência^[28].

Nas décadas que passaram desde a introdução das fluoroquinolonas, a resistência das *Enterobacteriaceae* a estes agentes tornou-se comum e generalizada^[38].

Diversos estudos têm chamado a atenção para o aumento das estirpes de *E.coli* resistentes às quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina). Situação que, em parte, pode estar relacionada com o uso frequente destes antimicrobianos na profilaxia e tratamento de muitas infecções, em particular as infecções urinárias, o que pode explicar a elevada prevalência destas bactérias multirresistentes em infecções da comunidade. O aumento da resistência às quinolonas é um problema global, o que levou a IDSA (*Infectious Diseases of America*) a desaconselhar o uso generalizado das fluoroquinolonas, como terapêutica de primeira linha, no tratamento das infecções urinárias agudas^[39].

1.3.3.1. Gene *qnr*

Durante décadas pensou-se que o mecanismo de resistência das quinolonas era codificado cromossomicamente, contudo recentemente foram reportados três mecanismos de resistência mediados por plasmídeos. A resistência codificada no cromossoma resulta quer num aumento quer numa diminuição da permeabilidade relacionada com a perda de porinas, com a superprodução de bombas de efluxo que ocorrem naturalmente ou mutações nos alvos moleculares DNA girase e topoisomerase IV^[28].

Apesar de em 1990 ter sido sugerida a possibilidade de existência de resistência mediada por plasmídeos, só quase dez anos mais tarde, em 1998 foi identificado o primeiro gene de resistência às quinolonas mediado por plasmídeo, o determinante *qnr* que codifica uma proteína que protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição pelas quinolonas. Correntemente existem cinco famílias de genes *qnr*: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*^[28].

As proteínas Qnr são capazes de proteger a DNA girase das quinolonas e estão em circulação há pelo menos 20 anos. Durante este tempo tiveram uma distribuição global numa variedade de ambientes plasmídicos e géneros bacterianos. Foram descobertos mais dois mecanismos adicionais. AAC(6')-Ib-cr, uma aminoglicosídeo acetiltransferase variante, capaz de reduzir a actividade da ciprofloxacina, é também transportada em plasmídeos e pode ser mais prevalente do que as proteínas Qnr. A extrusão de quinolonas, um mecanismo de resistência prevalentemente codificado pelo cromossoma, também existe em plasmídeos^[38].

O *qnr* é um alelo que ocorre naturalmente que codifica para uma proteína que confere susceptibilidade reduzida ao ácido nalidíxico ou a uma fluoroquinolona^[38]. Estes genes codificam proteínas que bloqueiam a acção da ciprofloxacina na DNA girase bacteriana e topoisomerase IV^[40]. As famílias *qnr* são definidas por uma diferença de 30% ou mais nos nucleótidos ou aminoácidos derivados. Dentro de cada família, os alelos *qnr* diferem num ou mais aminoácidos^[38].

As quinolonas inibem o superenrolamento do DNA mediado pela DNA girase e a decatenação mediada pela topoisomerase IV. O QnrA purificado reverteu esta inibição das quinolonas sobre a actividade da DNA girase e topoisomerase IV de um modo dependente da dose^[38]. Foi proposto que a protecção contra as quinolonas pelo QnrA seja o resultado da ligação da QnrA à girase ou topoisomerase IV num local sobreposto ao local de ligação do DNA^[38].

Em geral, a aquisição de um plasmídeo transportando *qnrA* não torna um organismo selvagem insusceptível às fluoroquinolonas de acordo com os *breakpoints* clínicos da CLSI. A presença de um plasmídeo *qnr* aumenta as CMI entre 16x a 125x. Ao aumentar a CMI e alargando a janela de selecção de mutantes, o Qnr pode conduzir a uma eficácia terapêutica diminuída^[38].

Os plasmídeos que transportam *qnrS* e *qnrB* conferem resistência às quinolonas de um modo similar ao conferido pelo *qnrA*₁^[38].

Como regra o fenótipo de resistência não distingue entre resistência mediada por plasmídeos e outros mecanismos de resistência. O rastreio dos genes *qnr* é feito por amplificação por PCR dos genes alvo^[38].

Plasmídeos que transportam *qnrA* podem também codificar β -lactamases de espectro alargado. Estirpes *qnr*-positivas frequentemente expressam ESBL como CTX-M-15 e SHV-12. Foi estabelecida uma relação estatística entre a produção de CTX-M e a

resistência ao ácido nalidíxico ou fluoroquinolonas e esta associação pode ser em parte explicada pela elevada incidência dos genes *qnr* neste tipo de ESBL^[40].

1.3.3.2. Gene *aac(6′)-Ib-cr*

Recentemente foi relatado um novo mecanismo de resistência a quinolonas transferível: inativação enzimática de certas quinolonas. A variante *cr* do *aac(6′)-Ib*, *aac(6′)-Ib-cr*, codifica uma aminoglicosídeo acetiltransferase que confere resistência à tobramicina, amicacina e kanamicina e susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina pela acetilação do azoto amínico nos substituintes piperazinil^[28, 38, 40]. Esta enzima tem duas substituições aminoacídicas, Trp102Arg e Asp179Tyr. Estas substituições são responsáveis pela capacidade da enzima em acetilar a ciprofloxacina^[28, 38].

O aumento na CMI conferido pela AAC(60′)-Ib-cr é menor do que o conferido pelas proteínas Qnr^[38].

O *aac(6′)-Ib-cr*, encontra-se numa cassette em integrões com um local *attC* associado. É assim encontrado em vários integrões^[38].

O *aac(6′)-Ib-cr* tem sido associado com outros genes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos como *qnrA₁*, *qnrB₂*, *qnrB₄*, *qnrB₆*, *qnrB₁₀*, *qnrS₁*, *qnrS₂* e *qepA* e com outras β-lactamases incluindo CTX-M-1, CTX-M-4, CTX-M-24, DHA-1, SHV-12 e KPC-2^[38]. Os genes *qnr* e *aac(6′)-Ib-cr* e certas ESBL ou AmpC são frequentemente co-transmitidas e co-seleccionadas, existindo uma ligação genética entre estes elementos de resistência nos plasmídeos^[40].

Uma preocupação que surgiu dos estudos epidemiológicos é a associação da AAC(6′)-Ib-cr com a CTX-M-15^[38].

1.3.4. Fosfomicina

A fosfomicina foi descoberta em 1968 como um metabolito secundário de várias espécies de *Streptomyces*^[41].

A fosfomicina, tem um mecanismo único de acção antimicrobiana que envolve a inibição da UDP-N-acetilglucosamina enolpiruviltransferase (*murA*), uma enzima que catalisa o primeiro passo na síntese da parede celular bacteriana. A fosfomicina tem um amplo especto de actividade antimicrobiana, incluindo actividade contra várias bactérias aeróbias de Gram negativo e positivo^[42].

A sua estrutura química apresenta novas características, com um grupo epóxido estável e uma ligação directa carbono-fósforo, ambas necessários para a actividade terapêutica. Estas características explicam a ausência de resistência cruzada com outros antibióticos usados na terapêutica. Não tem quase toxicidade para o ser humano e não tem afinidade para as proteínas plasmáticas, o que explica em parte a sua falta de indução de reacções alérgicas. A fosfomicina pode ser administrada

parentericamente e oralmente e mostra uma excelente penetração nos fluidos biológicos, com excreção renal do composto activo e tempos de depuração curtos^[41].

Uma dose única de fosfomicina-trometamol é eficaz para o tratamento de infecções do tracto urinário não complicadas^[42]. A fosfomicina pode ser uma boa alternativa para o tratamento antimicrobiano de primeira linha de ITU não complicadas^[31].

A fosfomicina também parece uma opção razoável para outras bactérias além de *E.coli* tais como *Enterococcus spp*^[31].

A fosfomicina tem um bom nível de actividade antimicrobiana contra isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* que produzem ESBL. A *E.coli* parece ser a mais susceptível à fosfomicina entre as *Enterobacteriaceae* que produzem ESBL. Existem dados clínicos que suportam a ideia de que a fosfomicina tem valor no tratamento de ITU inferior causadas por *E.coli* produtora de ESBL^[42].

A fosfomicina é captada para as células por transporte activo através do sistema de captação parcialmente constitutivo L- α -glicerolfosfato. Um sistema de transporte secundário, que medeia a captação da hexosefosfato, pode ser induzido pela glucose-6-fosfato. A maior parte dos mutantes cromossomicamente resistentes têm uma falha num ou em ambos destes sistemas de captação. Mutações que diminuem a afinidade da fosfomicina para a sua enzima alvo também tornam as células resistentes^[41].

O uso de fosfomicina seleccionou um outro tipo de organismos resistentes que incorporam activamente o fármaco e têm uma enolpiruvil transferase completamente sensível, indicando que o mecanismo de resistência é diferente do previamente descrito. Eles são geralmente multirresistentes, podem transferir a sua resistência através de conjugação ou transformação, indicando uma localização plasmídica para o determinante Fo^R^[41].

Apesar da função fisiológica precisa das proteínas FosA de *K.pneumoniae*, permanecer por determinar, especula-se que estas proteínas são a origem das enzimas modificadores da fosfomicina mediadas por plasmídeos tais como FosA₃ codificadas cromossomicamente^[43].

1.3.5. Trimetoprim

O trimetoprim está disponível desde 1962 e foi o último agente antibacteriano verdadeiramente novo introduzido na prática clínica. Todos os outros agentes desenvolvidos eram variações de antibióticos antigos, pertencendo a famílias de agentes dentro das quais a resistência cruzada era comum^[28].

O trimetoprim é um antibiótico sintético. Com a sua estrutura similar à do ácido fólico, o trimetoprim é um inibidor competitivo da dihidrofolato redutase (DHFR). A DHFR catalisa a redução NADPH-dependente do ácido dihidrofólico à coenzima activa

tetrahidrofolato. Deste modo, o trimetoprim pode ser considerado um antifolato, um análogo estrutural do ácido fólico^[28, 44].

Devido à sua elevada concentração na urina, que é suficiente para inibir a maioria dos patógenos urinários, o trimetoprim, isolado ou combinado com sulfonamidas, tem sido usado para o tratamento de infecções urinárias^[44].

A resistência bacteriana ao trimetoprim pode ser inerente ou adquirida. Os mecanismos mais comuns envolvem a expressão de variantes da DHFR insensíveis ao trimetoprim, dentro de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposões e integrões^[44].

Estas enzimas pertencem a dois grupos distintos, designados DfrA e DfrB, que são codificados pelos genes *dfrA* e *dfrB*. As famílias *dfrA* e *dfrB* contêm vários membros. O grupo *dfrA* tem mais de 30 genes. O determinante *dfrA*₂₇ foi reportado em 2009 por Wey *et al.* O grupo *dfrB* tem apenas oito genes^[28].

Os membros do grupo DfrA têm cerca de 157 aminoácidos e são relacionados com as dihidrofolato redutases codificadas pelo cromossoma bacteriano. Vários dos genes *dfrA* conhecidos são encontrados em cassetes de genes. Os membros do segundo grupo, mais pequeno, DfrB, são proteínas de 78 aminoácidos que formam um tetrâmero que se liga tanto ao substrato, dihidrofolato, como ao co-factor, NADP, em posições equivalentes, permitindo assim que ocorra a redução do dihidrofolato^[28, 45].

1.4. Tipagem molecular - PCR *fingerprinting*

As técnicas de PCR *fingerprinting* são um método de tipagem simples e facilmente aplicável. Famílias de sequências de DNA curtas e repetitivas estão dispersas ao longo do genoma de diversas espécies bacterianas. Os elementos BOX são uma dessas famílias compostas por elementos de 154 pb. A distribuição generalizada destes elementos de DNA repetitivo nos genomas de vários microorganismos permite a rápida identificação de espécies e estirpes bacterianas^[46].

As sequências REP e ERIC são os alvos mais comuns para a tipagem de DNA, mas a sequência BOX tem sido utilizada para diferenciar *Streptococcus pneumoniae*. Recentemente o método foi utilizado para tipar diferentes géneros de *Pseudomonas*. O método BOX-PCR é utilizado para detectar diferenças no número e distribuição desta sequência repetitiva bacteriana em isolados clínicos.^[47]

O ensaio BOX-PCR tem como alvo sequências repetitivas intergénicas e produz *fingerprints* genómicos específicos de espécie e estirpe. O BOX-PCR utiliza um primer com uma sequência repetida altamente conservada^[47]. A amplificação das regiões genómicas localizadas entre estes elementos repetitivos resulta num padrão distintivo de cada estirpe^[48].

1.5. Objectivos

Este trabalho teve como objectivo geral o conhecimento da prevalência da ITU na comunidade e dos factores de resistência e virulência que a condicionam.

Os objectivos específicos foram.

- Conhecer a prevalência dos diferentes microorganismos responsáveis pela ITU na comunidade na população estudada durante o ano de 2010
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos das estirpes bacterianas isoladas de uroculturas na comunidade na população estudada durante o ano de 2010
- Estudar os principais mecanismos de resistência por meio de reacção em cadeia da polimerase (PCR) nos isolados de ITU recolhidos em 2011
- Estudar os principais factores de virulência em *E.coli* e *K.pneumoniae* e verificar se existe associação com o fenótipo de resistência nos isolados de ITU recolhidos em 2011.
- Verificar a existência de relação clonal entre estirpes isolados do mesmo doente e estirpes isoladas de doentes da mesma instituição de cuidados terciários.

2. - Material e Métodos

2.1. Local de realização das experiências

Este projecto foi desenvolvido em duas fases:

O estudo da prevalência da ITU e da resistência a antibióticos no ano de 2010 foi efectuado no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Jorge Leitão Santos.

A segunda fase, estudo de genes de resistência e factores de virulência em isolados de 2011, foi efectuada no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

2.2. Estudo da Prevalência da ITU em 2010

Numa primeira fase foi efectuado o estudo da prevalência da infecção do tracto urinário e da resistência a antibióticos no ano de 2010, na comunidade servida pelos seguintes laboratórios: Laboratório de Análises Clínicas Dr. Jorge Leitão Santos, Labodiag – Olga Pereira – Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Análises Clínicas Dra. Maria Antonieta da Cruz Sampaio e respectivos postos de colheita. Foram analisadas 8869 amostras urinárias com pedido de urocultura que deram entrada nos laboratórios e respectivos postos de colheita entre 1 de Janeiro de 2010 e 31 de Dezembro de 2010.

TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS URINÁRIAS COM PEDIDO DE UROCULTURA POR LOCALIDADE	
Localidades	Nº urinas analisadas
Alcobaça	64
Alcoentre	13
Alverca do Ribatejo	2604
Arruda dos Vinhos	628
Coruche	717
Moscavide, Bobadela	451
Póvoa de Santa Iria	1311
Rio Maior	1592
Sapataria	21
Sobralinho	132
Vialonga	377
Vila Franca de Xira	959
Total	8869

As urinas foram semeadas com ansa calibrada de 10 µl em meio de cultura ChromID® CPS (bioMérieux) e incubadas 16-24 h a 36±1°C. O meio CPS é um meio cromogénico utilizado para o diagnóstico da infecção urinária que permite a contagem de microorganismos, a identificação directa de *E.coli* e *Proteus* spp. e a identificação preliminar de *Enterococcus* e do grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*).

Consideraram-se positivas as culturas com uma contagem superior a 10⁵ UFC/ml e também as contagens superiores a 10³ ufc/ml quando existia piúria concomitante (mais de 10 leucócitos /campo (x40) em urina centrifugada. As urinas polimicrobianas foram consideradas contaminadas.

Nas amostras com presença de infecção urinária foi efectuada a identificação do microorganismo envolvido e efectuado o antibiograma. A identificação das bactérias não identificadas directamente pelo CPS foi executada através de galerias API® 20E (bioMérieux) ou por identificação no equipamento automático Vitek® 2 Compact (bioMérieux) utilizando cartas específicas (Cartas GN para identificação de Gram negativos e GP para identificação de Gram positivos). O Vitek® 2 Compact é um sistema automatizado que permite identificar mais de 95% dos isolados clínicos de rotina em cerca de 8 horas.

A determinação da sensibilidade antibiótica, de Janeiro de 2010 a Agosto de 2010, foi efectuada utilizando galerias ATB®-UR (bioMérieux) para os bacilos Gram negativos, e o método de difusão em disco para a determinação da susceptibilidade dos cocos Gram positivos. O método de difusão foi realizado em meio Mueller Hinton (Biomérieux) e Mueller Hinton + 5% sangue de carneiro (bioMérieux), utilizando-se discos de antibióticos (bioMérieux). De Setembro de 2010 a Dezembro de 2010 utilizou-se o equipamento Vitek® 2 Compact (bioMérieux), utilizando cartas específicas. Os antibióticos testados estão descritos nas tabelas 6 a 10. A interpretação dos resultados fez-se utilizando os critérios definidos nas normas da CLSI^[49].

TABELA 6– ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS GALERIAS ATB-UR			
Antibiótico	Concentração (mg/l)	Antibiótico	Concentração (mg/l)
Amoxicilina	8 e 16	Ácido nalidíxico	16
Amoxicilina + ácido clavulânico	8/4 e 16/8	Fosfomicina	64
Piperacilina	16 e 64	Tobramicina	4
Cefalotina	8 e 16	Amicacina	16
Cefuroxima axetil	8 e 16	Gentamicina	4
Cefoxitina	8	Netilmicina	32
Imipenem	4	Nitrofurantoína	32
Ceftazidima - 1	1	Cotrimoxazol	2/38
Cefotaxima	8 e 32	Norfloxacina	4 e 8
Ceftazidima	8 e 16	Ciprofloxacina	1 e 2

TABELA 7 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS CARTAS VITEK AST N-113 - ENTEROBACTÉRIAS

Antibiótico	Concentração (mg/l)	Antibiótico	Concentração (mg/l)
BLSE	FEP 1, CTX 0,5, CAZ 0,5, FEP/CA 1/10, CTX/CA 0,5/4, CAZ/CA 0,5/4	Imipenem	2/4/16
Ampicilina	4/8/32	Amicacina	8/16/64
Amoxicilina + ácido clavulânico	4/2, 16/8, 32/16	Gentamicina	4/16/32
Cefalotina	4/8/32	Tobramicina	8/16/64
Cefuroxima	2/8/32	Ácido nalidíxico	8/16/32
Cefoxitina	8/16/32	Ciprofloxacina	0,5/2/4
Cefotaxima (CTX)	1/4/16/32	Fosfomicina	8/16/32
Ceftazidima (CAZ)	1/2/8/32	Nitrofurantoína	16/32/64
Cefepima (FEP)	2/8/16/32	Trimetoprim/sulfametoxazol	1/19, 4/76, 16/304
Ertapenem	0,5/1/6		

TABELA 8 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS CARTAS VITEK AST N-093 BACILOS GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES

Antibiótico	Concentração (mg/l)	Antibiótico	Concentração (mg/l)
Ticarcilina	16/32/64	Gentamicina	4/16/32
Ticarcilina/Ácido clavulânico	8/2, 32/2, 64/2	Isepamicina	4/8/32
Piperacilina	4/16/32/64	Tobramicina	8/16/64
Piperacilina/Tazobactam	4/4, 16/4, 32/4, 64/4	Ciprofloxacina	0,5/2/4
Ceftazidima	1/2/8/32	Pefloxacina	0,5/2/8
Cefepima	2/8/16/32	Minociclina	2/4/8
Aztreonam	2/8/32	Colistina	4/16/32
Imipenem	2/4/16	Rifampicina	2/4/16
Meropenem	0,5/4/16	Trimetoprim/sulfametoxazol	1/19, 4/76, 16/304
Amicacina	8/16/64		

TABELA 9 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS CARTAS VITEK AST P-586 – STREPTOCOCCUS SP E ENTEROCOCCUS SP

Antibiótico	Concentração (mg/l)	Antibiótico	Concentração (mg/l)
Benzilpenicilina	0,125/0,25/1/2/8/64	Clindamicina	0,5/1/2
Ampicilina	0,5/4/8/32	Linezolid	0,5/1/2
Ampicilina/sulbactam	4/2, 8/4, 16/8, 64/32	Teicoplanina	1/4/8/16
Cefuroxima	1/4/16	Vancomicina	1/2/4/8/16
Imipenem	2/4/8	Tetraciclina	0,5/1/2
Gentamicina alto nível (sinergia)	500	Tigeciclina	0,25/0,5/1
Estreptomicina alto nível	1000	Nitrofurantoína	16/32/64
Levofloxacina	0,25/2/8	Trimetoprim/sulfametoxazol	8/152, 16/304, 32/608

Moxifloxacina	0,25/2/8	Eritromicina	0,25/0,5/2
---------------	----------	--------------	------------

TABELA 10 – ANTIBIÓTICOS TESTADOS NAS CARTAS VITEK AST -P580 – STAPHYLOCOCCUS SP

Antibiótico	Concentração (mg/l)	Antibiótico	Concentração (mg/l)
Teste de screening de cefoxitina	6	Teicoplanina	1/4/8/16
Benzilpenicilina	0,125/0,25/1	Vancomicina	1/2/4/16
Oxacilina	0,5/1/2	Tetraciclina	0,5/1/2
Gentamicina	8/16/64	Tigeciclina	0,25/0,5/1
Tobramicina	16/32/64	Fosfomicina	8/32
Levofloxacina	0,25/2/8	Nitrofurantoína	16/332/64
Moxifloxacina	0,25/2/8	Ácido fusídico	0,5/1/4
Resistência induzida à clindamicina	0,5	Mupirocina	1
Eritromicina	0,25/0,5/2	Rifampicina	0,25/0,5/2
Clindamicina	CC 0,5/CC/E 0,25/0,5	Trimetoprim/sulfametoxazol	8/152, 16/304, 32/608
Linezolid	0,5/1/2		

Foi efectuada a recolha dos dados demográficos dos doentes (idade, sexo) e situação clínica (grávida, doente acamado, algaliado, diabético, com infecções recorrentes, internamento hospitalar, doente em lar de acolhimento, etc.), recorrendo ao programa informático do laboratório - e-DeiaLab da Slice[®].

A informação reunida foi organizada numa base de dados electrónica (Microsoft[®] Excel) para tratamento estatístico e apuramento dos resultados.

2.3. Estudo da Resistência e Virulência em 2011

2.3.1. Estirpes bacterianas

Durante o primeiro semestre do ano de 2011 foram seleccionadas 60 estirpes bacterianas (42 *E.coli*, 17 *K.pneumoniae* e 1 *P. aeruginosa*) isoladas de amostras urinárias que apresentavam resistência a um ou mais antibióticos testados e 47 estirpes (42 *E.coli* e 5 *K.pneumoniae*) que não apresentavam resistência a nenhum dos antibióticos testados.

A identificação e antibiograma das estirpes isoladas foi efectuada com o equipamento automático Vitek[®] 2 Compact (bioMérieux), utilizando cartas ID GN e AST-N-113 já descritas para a parte 1.

2.3.2. Purificação e conservação dos isolados

As estirpes foram repicadas do meio ChromID[®] CPS (bioMérieux) onde foram isoladas originalmente para meio sólido em tubo onde foram conservadas à temperatura ambiente.

2.3.3. Isolamento do DNA

O isolamento do DNA foi efectuado pela técnica de *boiled*. Foi efectuada uma repicagem das estirpes conservadas em meio de conservação para meio de Mueller-Hinton (bioMérieux). Após incubação *overnight*, a $36\pm 1^\circ\text{C}$, foi efectuada uma suspensão densa das colónias em 1 ml de água bidestilada estéril (ABE) em tubo *ependorf*. As células foram lisadas por aquecimento a 95°C durante 10 minutos. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 12000 rpm por 2,5 minutos (Centrifuge 5415R, Eppendorf) e transferiu-se o sobrenadante (750 μL) para tubos de PCR. Este DNA foi conservado a -20°C e foi utilizado como molde nas reacções de PCR.

2.3.4. Amplificação de genes por reacção em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

As técnicas moleculares têm demonstrado elevado interesse no diagnóstico e terapêutica das doenças infecciosas, promovendo um conhecimento aprofundado dos mecanismos de resistência e virulência de microrganismos clinicamente relevantes.

O método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite a amplificação específica de genes cuja presença se procura confirmar. O amplicão originado com os *primers* indicados é depois purificado, sequenciado e analisado. Esta reacção, requer uma extracção prévia do DNA das células, de forma a estar disponível para os *primers*, nucleótidos e DNA polimerase.

O DNA obtido pela técnica de *boiled* foi utilizado como molde nas reacções de PCR. Testou-se por PCR a presença de genes associados a resistência a antibióticos e associados a factores de virulência. Os genes pesquisados foram os seguintes:

- β -lactamases:
 - *bla*_{TEM}
 - *bla*_{CTX}
 - *bla*_{SHV}
- Resistência a quinolonas:
 - *qnrB*
 - *qnrS*
 - *aac(6')-Ib-cr*
- Resistência à fosfomicina
 - *fosA*
- *fosA*₃
- Integções de classe 1
- Factores de virulência de *E.coli*
 - *fimH*
 - *papC*
 - *ecpA*
- Factores de virulência de *K.pneumoniae*
 - *fimH*
 - *mrkD*
 - *khe*

Os *primers* utilizados para cada reacção estão descritos na tabela 11.

TABELA 11 – SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA A PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA E FACTORES DE VIRULÊNCIA

Gene	Peso molecular (pb)	Primer	Sequência nucleotídica (5' -> 3')	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	1058	Lena 1N MJC 1	GAA AGG GCC TCG TGA TAC TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC ACC	[50]
<i>bla</i> _{SHV}	886	SV1 SV2	CAC TCA AGG ATG TAT TGT G TTA GCG TTG CCA GTG CTC G	[51, 52]
<i>bla</i> _{CTX}	544	CTX1 CTX2	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG S=C+G; Y=C+T; R=A+G	[53]
Integração Classe 1	variável	In5' CS In3' CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG AAG CAG ACT TGA CCT GA	[54]
<i>ecpA</i>	336	EcpAF EcpAR	AAG CTG GTT GTG ACG CCA C GAA ACC ATC CTG TGC GGT G	[21]
<i>papC</i>	1174	PAP1 PAP2	GAG TTA TAC GGG AGC CAG CCT GGA AGC ACT GAC GCC GAA AGA	[55]
<i>fimH</i>	465	fimH-F fimH-R	AAC AGC GAT GAT TTC CAG TTT GTG TG ATT GCG TAC CAG CAT TAG CAA TGT CC	[56]
<i>khe</i>	428	kheNOVOF kheNOVOR	TGA TTG CAT TCG CCA CTG G GGT CAA CCC AAC GAT CCT GG	[57] desenhado
<i>mrkD</i> _{V1}	309	mrkD2F mrkD2R	CGG TGA TGC TGG ACA TGG T CYT CSA GSG AAT AGT TGG TGG	desenhado
<i>mrkD</i> _{V2,3,4}	950	mrkD3F mrkD3R	CTT RAT GGC GMT GGG SAC CA TCA TRT GCG AYT CCA CCT CRC	desenhado
<i>fimH</i> (Kleb)	512	fimHNovoF fimHNovoR	TGT TCA CCA CCC TGC TGC TG CAC CAC GTC GTT RTT GGC GTA	[58]
<i>fosA3</i> Escherichia coli	330	fosA3 F fosA3 R	GGG ATT GAA TCA TCT GAC GC TCA AAA AAG ACC ATC CCC TT	[43]
<i>fosA</i>	398	fosA F fosA R	GGA CTG AAT CAC CTG ACC CT AAC ACC ATC CCC TTA TAC GG	[59]
<i>aac 6' -Ib-cr</i>	620	aacr-F aacr-R	TGA GCA ACG CAA AAA CAA AG TTA GGC ATC ACT GCG TGT TC	[60]
<i>qnrS</i>	420	QnrS-F QnrS-R	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC	[61]
<i>qnrB</i>	507	QnrB-F QnrB-R	GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG CGA TGC CTG GTA GTT GTC C	[62]

As reacções de PCR foram realizadas segundo protocolos anteriormente descritos, em tubos de 0,2 ml num volume total de 20 µl.

A mistura de reacção para cada PCR foi a seguinte:

- 10 µl master mix (DyNazyme[®] II PCR Master Mix: contém DyNAzyme[®] II DNA polimerase 0,04 U/µl, 400 µM de cada dNTP, tampão de reacção 2x com MgCl₂ - 1,5 mM na concentração final de reacção) (Finnzymes - ThermoFisher Scientific)
- 6 µl ABE
- 1 µl Primer 1 (*forward*) + 1 µl Primer 2 (*reverse*) (Invitrogen[®])
- 2 µl DNA (quando se verificou haver pouca concentração de DNA substituiu-se os 6 µl ABE + 2 µl DNA por 8 µl DNA)

As reacções decorreram em dois termocicladores - T gradient e T personal (Biometra). Foram utilizados programas específicos para cada amplificação que estão descritos na tabela 12.

TABELA 12 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR – PROGRAMAS UTILIZADOS				
GENE	Passos (P)	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
<i>bla_{TEM}</i>	1	95	3 min	35
	2	94	1 min 30 seg	
	3	56,5 ou 56	1 min 30 seg	
	4	70	1 min 30 seg	
	5	70	9 min	
	6	4	Pausa	
<i>bla_{SHV}</i>	1	96	30 seg	45
	2	96	30 seg	
	3	50	15 seg	
	4	72	2 min	
	5	72	8 min	
	6	4	Pausa	
<i>bla_{CTX}</i>	1	94	3 min	21
	2	94	1 min	
	3	61/59	1 min	
	4	72	3 min	
	5	72	7 min	
	6	4	Pausa	
Integração de classe 1	1	94	5 min	35
	2	94	1 min	
	3	55	1 min	
	4	72	5 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>ecpA</i>	1	94	10 min	31
	2	94	1 min	
	3	53	1 min	
	4	72	1 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>papC</i>	1	94	10 min	26
	2	94	30 seg	
	3	60	30 seg	
	4	72	1 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>fimH</i>	1	94	10 min	26
	2	94	30 seg	
	3	60	30 seg	
	4	72	1 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>khe</i>	1	94	10 min	30
	2	94	30 seg	
	3	59,25	30 seg	
	4	72	1 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>mrkD_{v2,3,4}</i>	1	94	10 min	30
	2	94	30 seg	
	3	61,25	30 seg	
	4	72	1:30 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>mrkD_{v1}</i>	1	94	10 min	30
	2	94	30 seg	
	3	60	30 seg	
	4	72	30 SEG	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>fimH K</i>	1	94	10 min	30
	2	94	30 seg	

	3	61,3	30 seg	
	4	72	1 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>fosA3</i>	1	94	5 min	30
	2	94	1 min	
	3	58	1 min	
	4	72	2 min	
	5	72	8 min	
	6	4	Pausa	
<i>fosA</i>	1	94	5 min	30
	2	94	1 min	
	3	58	1 min	
	4	72	2 min	
	5	72	8 min	
	6	4	Pausa	
<i>aac-(6')-Ib-cr</i>	1	95	3 min	25
	2	95	1 min	
	3	55,5	1 min	
	4	72	3 min	
	5	72	7 min	
	6	4	Pausa	
<i>qnrS</i>	1	94	5 min	31
	2	94	45 seg	
	3	53	45 seg	
	4	72	1 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	
<i>qnrB</i>	1	94	5 min	31
	2	94	45 seg	
	3	53	45 seg	
	4	72	1 min	
	5	72	10 min	
	6	4	Pausa	

2.3.5. Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose (*Agarose electrophoresis grade* - Invitrogen®), com uma concentração de 1% em tampão TAE 1X, ao qual se adicionou brometo de etídio (BioRad) a uma concentração final de 10 mg/ml. Foram aplicados 5 µl de cada produto amplificado no gel, utilizando uma solução de azul de bromofenol como tampão de carga (azul de bromofenol 0,25% (m/m), xileno cianol 0,25% (m/v), glicerol em água 30% (v/v)).

O gel foi submetido a uma voltagem constante de 190V durante 55 minutos. Foi utilizada a Fonte de Alimentação – Electrophoresis Power supply EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech). Os géis foram visualizados e fotografados sob luz UV num transluminador (Kodak), sendo a imagem do gel digitalizada. O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por comparação com a migração dos fragmentos de peso molecular conhecido do marcador introduzido em cada electroforese. O marcador utilizado foi o Gene Ruler® 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

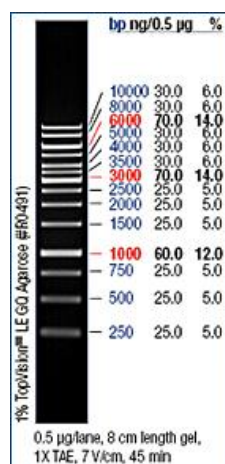


Figura 3 – Gene Ruler® 1 kb DNA Ladder (<http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders/sm0313-generuler->)

Na tabela 13 encontra-se a descrição dos tampões utilizados nas electroforeses:

TABELA 13 – TAMPÕES UTILIZADOS NA ELECTROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR		
Tampão	Solução de trabalho	Solução Stock
TAE	1x 40 mM Tris-acetato 1 mM EDTA	50X 242 g Tris base 57,1 ml ácido acético glacial 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0)
TBE	0,5x 45 mM Tris-borato 1 mM EDTA	5X 54 g Tris base 27,5 g de ácido bórico 20 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0)

2.3.6. Purificação de Produtos de PCR

Para completar a caracterização genética das bactérias é necessário sequenciar os produtos obtidos na amplificação por PCR. Sendo a sequenciação um processo complexo e sensível é necessário garantir que a amostra a analisar contém apenas o DNA pretendido. Deste modo as amostras que foram seleccionadas para sequenciar foram purificadas utilizando kits comerciais para o efeito e seguindo as instruções do fabricante. Utilizou-se o kit de purificação – NZYGelpure (nzytech genes & enzymes). Este kit de purificação utiliza uma membrana de sílica-gel que adsorve até 10 µg de fragmentos de DNA na presença de tampões de ligação específicos. A agarose solúvel, nucleótidos, oligos, enzimas, óleo mineral e outras impurezas não se ligam à membrana e são eliminados com as lavagens. Os fragmentos do DNA são então eluídos da coluna com o tampão de eluição.

2.3.7. Sequenciação do DNA

Foram seleccionados alguns produtos obtidos por PCR para confirmação por sequenciação. Após purificação as amostras foram enviadas juntamente com os *primers* para os Laboratórios Macrogen (Seoul, Coreia do Sul) onde foram sequenciadas utilizando o sequenciador 3730XL DNA *sequencer*.

2.3.8. Método informáticos

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas por *software* disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) - BLAST® – *Basic Local Alignment Search Tool*, e no EMBL-EBI – *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk>) - ClustalW2 *Multiple Sequence Alignment*.

O programa BLAST® permite a análise das sequências nucleotídicas obtidas comparando as sequências nucleotídicas com as existentes na base de dados do NCBI e calcula o significado estatístico dos emparelhamentos.

O programa ClustalW2 é um programa de alinhamento de múltiplas sequências, para DNA e proteínas. Produz alinhamentos de várias sequências divergentes, podendo ser verificadas as homologias e diferenças entre as sequências.

Foi realizada a análise estatística dos resultados com o *software* IBM SPSS *statistics*. Foi utilizado o teste do χ quadrado de Pearson e o teste exacto de Fisher para comparações entre grupos.

2.3.9. Tipificação molecular

A tipificação molecular de alguns isolados seleccionados foi realizada por BOX PCR *fingerprinting*. Utilizou-se o *primer boxA1R* - CTA CGG CAA GGC GAC CGT GAC G (Invitrogen®). A reacção foi efectuada utilizando Illustra puREtaq Ready-To-Go® PCR Beads (GE Healthcare) em que os únicos reagentes a adicionar foram água, *primers* e o DNA molde. Foi utilizado um volume de reacção de 25 μ l.

- 22 μ l ABE
- 1 μ l Primer
- 2 μ l DNA

Foi utilizado o termociclador T gradient (Biometra). As condições de PCR utilizadas estão descritas na tabela 14.

BOX	1	98	5 min	35
	2	98	20 seg	
	3	53	1 min	
	4	72	20 seg	
	5	72	5 min	
	6	4	Pausa	

Os fragmentos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,75% em tampão TBE 1X. Foi utilizada a Fonte de Alimentação – Electrophoresis Power supply EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech). O gel foi submetido a uma voltagem constante de 150V durante 2h30. O gel foi corado posteriormente com

brometo de etídio e visualizado com luz UV. O padrão das bandas obtidas foi avaliado visualmente. A observação das bandas de electroforese, permite definir um perfil electroforético, característico de uma estirpe bacteriana. Os isolados que apresentavam bandas diferentes após a electroforese dos produtos de PCR foram considerados clonalmente não relacionados.

2.3.10. Testes fenotípicos para detecção de resistência - Pesquisa de β -lactamases

2.3.10.1. Pesquisa de metalo- β -lactamases (MBL) – teste de inibição com EDTA

O grupo mais importante de carbapenemases são as β -lactamases de classe B ou metalo- β -lactamases. As enzimas principais são as IMP e VIM. Elas geralmente hidrolisam cefalosporinas de 3ª geração, bem como carbapenemos mas não o Aztreonam. As MBL caracterizam-se por necessitarem de iões bivalentes, usualmente Zn^{2+} como co-factor para a reacção de hidrólise do anel beta-lactâmico, podendo ser detectadas por meio de testes fenotípicos com o auxílio de um agente quelante como o EDTA^[64, 65]. Utilizando um teste de difusão em disco baseado na sinergia entre discos contendo substrato e um disco contendo um inibidor da MBL (EDTA) pode-se detectar a sua presença^[65].

O método consiste na inoculação do isolado num placa de Mueller-Hinton do mesmo modo que para a realização de um antibiograma. São posicionados na placa discos contendo substratos como o imipenem e ao lado um disco estéril de papel contendo uma solução de agente quelante ou utilizando discos em duplicado e num deles inoculando a solução do agente quelante. Em amostras produtoras de metalo- β -lactamases observa-se aumento do halo de inibição com o agente quelante. Em testes negativos não se observam alterações no halo de inibição de crescimento da bactéria^[66].

Fez-se o antibiograma das amostras seleccionadas (resistentes aos carbapenemos) utilizando 2 discos de imipenem (IMI) (10 μ g), 2 de ticarcilina (TIC) (75 μ g) e 2 aztreonam (ATM)(30 μ g) em duplicado. Num dos discos de cada par inoculou-se 15 μ l EDTA (100 μ M), se a diferença nos halos for ≥ 5 mm confirma-se a presença de metalo- β -lactamase.

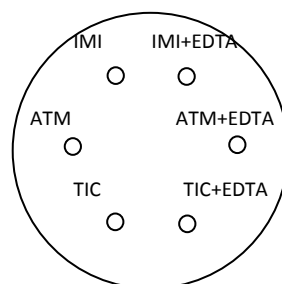


Figura 4 – Esquema do teste de inibição com EDTA

2.3.10.2. Pesquisa de AmpC - Teste de inibição com a cloxacilina

As β -lactamases da classe C de Ambler hidrolisam cefalosporinas de primeira e segunda geração, incluindo as cefamicinas e em menor medida as de terceira geração, enquanto que geralmente são pouco eficientes na hidrólise das cefalosporinas de quarta geração e carbapenemos. A cloxacilina assim como o ácido borónico e seus derivados inibem as β -lactamases de tipo AmpC, enquanto que o ácido clavulânico não é um bom inibidor^[64]. As AmpC podem ser detectadas pelo teste de sinergia com a cloxacilina^[65].

A produção da AmpC quer a induzível quer a produzida de modo estável, resultante de mutação, pode coexistir com a produção de uma ESBL. Quando a β -lactamase é induzível é detectado um efeito sinérgico. Pelo contrário, o efeito sinérgico não é visível quando a β -lactamase AmpC está a ser produzida estavelmente. Existem várias modificações do teste de dupla sinergia em disco para detectar o fenótipo ESBL em presença de AmpC. Realizando o teste utilizando cloxacilina, que inibe a actividade cefalosporinásica, consegue-se detectar o fenótipo ESBL em presença de AmpC^[67].

Fez-se o antibiograma das amostras resistentes à cefoxitina utilizando 2 discos de cefoxitina (30 μ g)(FOX), 2 de cefotaxima (30 μ g) (CTX) e 2 de ceftazidima (30 μ g) (CAZ). Num dos discos de cada par inoculou-se 15 μ l cloxacilina (10 mg/ml). A figura 5 exemplifica a disposição utilizada.

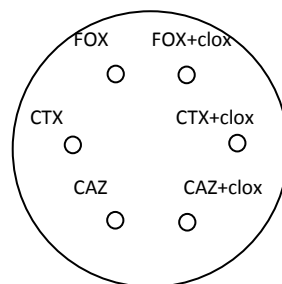


Figura 5 – Esquema do teste de inibição com cloxacilina

2.3.10.3. Pesquisa de KPC e ESBL - Teste de Inibição com ácido borónico

As KPC hidrolisam vários antibióticos β -lactâmicos e assim a presença de uma ESBL pode ser mascarada pela expressão de KPC. A inibição das KPC pelos inibidores dos β -lactâmicos pode interferir com a interpretação dos métodos de detecção das ESBL. Existe assim a necessidade de detectar ESBL na presença de co-expressão de KPC. O ácido borónico é um inibidor reversível das KPCs. Os testes utilizando discos com ácido borónico são considerados positivos para a detecção de KPC quando o diâmetro de inibição à volta dos discos de antibiótico com ácido borónico é ≥ 5 mm ao diâmetro dos discos de antibiótico sem ácido borónico. As ESBL não são inibidas pelo ácido borónico^[68]. O ácido borónico também inibe as β -lactamases de tipo AmpC^[64].

Fez-se o antibiograma com 2 discos de imipenem (IMI) (10 µg), 2 de cefotaxima (CTX) (30 µg) e 2 de ceftazidima (CAZ) (30 µg). Colocou-se um disco de amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg) no centro para verificar a existência de sinergia com os β-lactâmicos e deste modo identificar a presença de ESBL. Num dos discos de cada par inoculou-se 15 µl de ácido borónico. Na figura 6 encontra-se exemplificado o esquema utilizado.

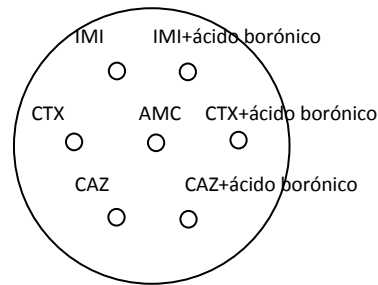


Figura 6 – Esquema do teste de inibição com ácido borónico

2.3.10.4. Pesquisa de β-lactamase utilizando um kit comercial

Utilizou-se o kit MAST ID[®] para detecção da β-lactamase AmpC e β-lactamase de largo espectro em simultâneo.

O kit é composto por quatro discos:

A – Discos de 10 µg de Cefpodoxima

B – Discos de 10 µg de cefpodoxima + inibidor da ESBL

C – Discos de 10 µg de Cefpodoxima + inibidor da AmpC

D – Discos de 10 µg de Cefpodoxima + inibidor da ESBL + inibidor da AmpC

Colocou-se um disco de cada tipo do conjunto de detecção MAST ID[®] no meio inoculado, garantindo um espaço suficiente entre os discos para permitir a formação de zonas de inibição claramente definidas. Incubou-se a 35-37°C durante 18 a 24 h. Mediu-se o diâmetro das zonas de inibição observadas. Os discos que não mostraram nenhuma inibição foram registados como 6 mm. Os resultados foram interpretados de acordo com a seguinte sequência:

Passo 1 – comparou-se a zona de inibição dos discos de Cefpodoxima (A) com a zona de inibição de cada disco de Cefpodoxima + inibidor (B,C,D). Se todas as zonas estão entre 2 mm de cada um, o organismo não apresenta actividade ESBL ou AmpC.

Passo 2 – subtraiu-se A de B, C de D, B de D e A de C. Se B-A e D-C ≥ 5 mm o organismo apresenta somente actividade ESBL.

Passo 3 – subtraiu-se A de B, C de D, B de D e A de C. Se B-A e D-C < 5 mm e D-B e C-A ≥ 5 mm o organismo apresenta somente actividade AmpC.

Passo 4 – subtraiu-se A de B e C de D. Se $D-C \geq 5$ mm mas $B-A < 5$ mm, o organismo apresenta actividade combinada de ESBL e AmpC.

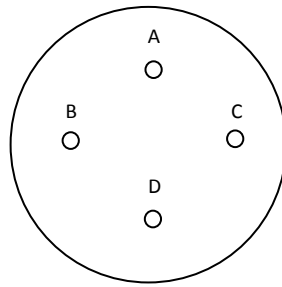


Figura 7 – Esquema do teste utilizando discos MAST ID[®]

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra – 1ª Parte

Durante o período de estudo (Janeiro a Dezembro de 2010), foram analisadas 8869 urinas com o pedido de urocultura, 1989 (22,4%) urinas pertenciam a indivíduos do sexo masculino e 6880 (77,6%) urinas pertenciam a indivíduos do sexo feminino. A distribuição dos pedidos de urocultura por mês e por sexo encontra-se na tabela 15.

TABELA 15 – DISTRIBUIÇÃO DOS PEDIDOS DE UROCULTURA POR MÊS E SEXO			
Mês	Total	Masculino	Feminino
Janeiro	794	179	615
Fevereiro	734	202	532
Março	888	207	681
Abril	791	171	620
Maió	745	151	594
Junho	716	163	553
Julho	720	130	590
Agosto	701	145	556
Setembro	795	193	602
Outubro	751	173	578
Novembro	690	141	549
Dezembro	544	134	410
Total pedidos	8869	1989	6880

As urinas foram provenientes de utentes de três laboratórios de análises clínicas de prestação de serviços à comunidade (Laboratório de Análises Clínicas Dr. Jorge Leitão Santos, Labodiag - Olga Pereira – Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Análises Clínicas Dr.ª M.ª Antonieta da Cruz Sampaio) distribuídos por três distritos – Lisboa, Leiria e Santarém – e seus respectivos postos de colheita das zonas de Alcobaça, Alcoentre, Alverca do Ribatejo, Arruda dos Vinhos, Bobadela, Coruche, Moscavide, Póvoa de Santa Iria, Rio Maior, Sapataria, Sobralinho, Vialonga e Vila Franca de Xira. A distribuição das amostras por localidade, concelho e distrito está descrita na tabela 16 e figura 8.

Localidades	Nº uroculturas positivas (n/%)
Alcobaça	14/21,9%
Alcoentre	1/7,7%
Alverca do Ribatejo	501/19,2%
Arruda dos Vinhos	110/17,5%
Coruche	83/11,6%
Moscavide, Bobadela	104/23,0%
Póvoa de Santa Iria	185/14,1%
Rio Maior	270/17,0%
Sapataria	10/47,6%
Sobralinho	39/29,5%
Vialonga	68/18,0%
Vila Franca de Xira	209/21,8%



Figura 8 - Distribuição do número de uroculturas positivas por distrito e concelho

Das 8869 urinas analisadas foi diagnosticada infecção urinária em 1594 urinas o que representa uma prevalência da ITU de 18,0%. A distribuição das uroculturas positivas por mês e por sexo encontra-se na tabela 17 e figura 9.

TABELA 17– DISTRIBUIÇÃO DAS UROCULTURAS POSITIVAS POR MÊS E SEXO						
	Positivas (Total) n	Positivas (Total) (%)	Positivas (Sexo F) n	Positivas (Sexo F) %	Positivas (Sexo M) n	Positivas (Sexo M) %
Janeiro	137	17,3	117	19,0	20	11,2
Fevereiro	118	16,1	96	17,8	22	11,3
Março	165	18,6	144	21,1	21	10,1
Abril	140	17,7	119	19,3	21	12,3
Maiο	122	16,4	97	16,4	25	16,6
Junho	137	19,1	114	20,8	23	14,5
Julho	139	19,3	113	19,2	26	20,0
Agosto	162	23,1	133	25,0	29	20,7
Setembro	137	17,2	119	19,8	18	9,3
Outubro	135	18,0	111	19,2	24	13,9
Novembro	115	16,7	100	18,2	15	10,6
Dezembro	87	16,0	76	18,5	11	8,2
Total	1594	18,0	1339	19,5	255	12,9

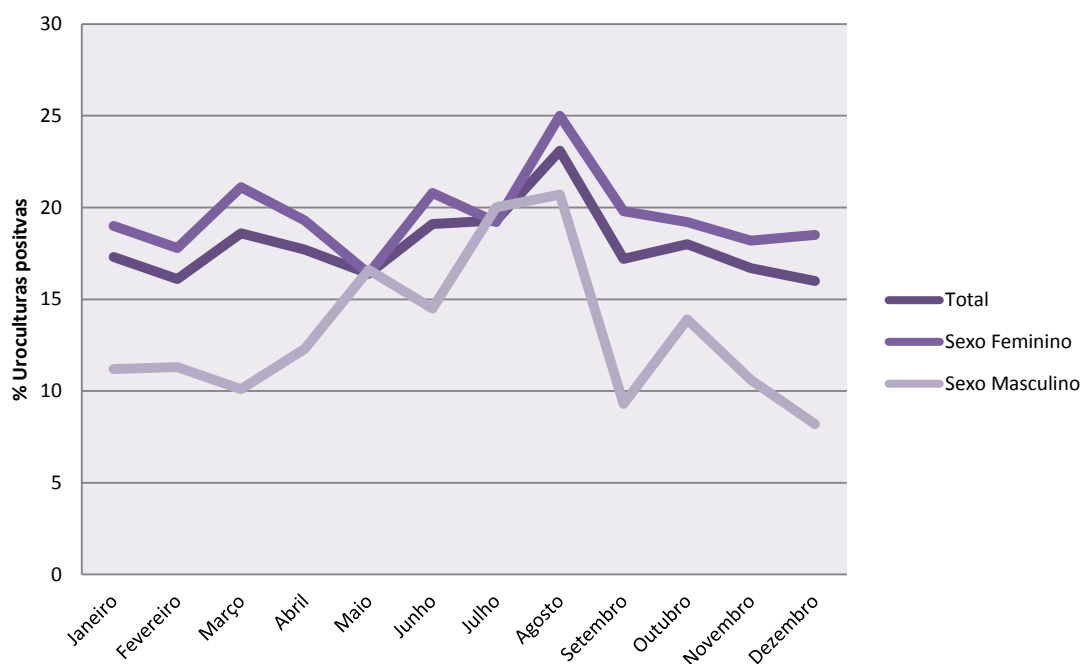


Figura 9 - Percentagem de uroculturas positivas por mês e sexo.

Das uroculturas positivas, 1339 (84,0%) correspondiam a indivíduos do sexo feminino e 255 (16,0%) a indivíduos do sexo masculino.

Verifica-se uma maior percentagem de uroculturas positivas nos meses de verão em ambos os sexos.

A média de idades dos doentes com uroculturas positivas foi de 55,2 anos (intervalo de 9 meses a 101 anos) no sexo feminino e de 61,9 anos (intervalo de 2 meses a 103 anos) no sexo masculino. Nas figuras 10 e 11 observa-se a distribuição do número de uroculturas positivas em função da idade e sexo do paciente.

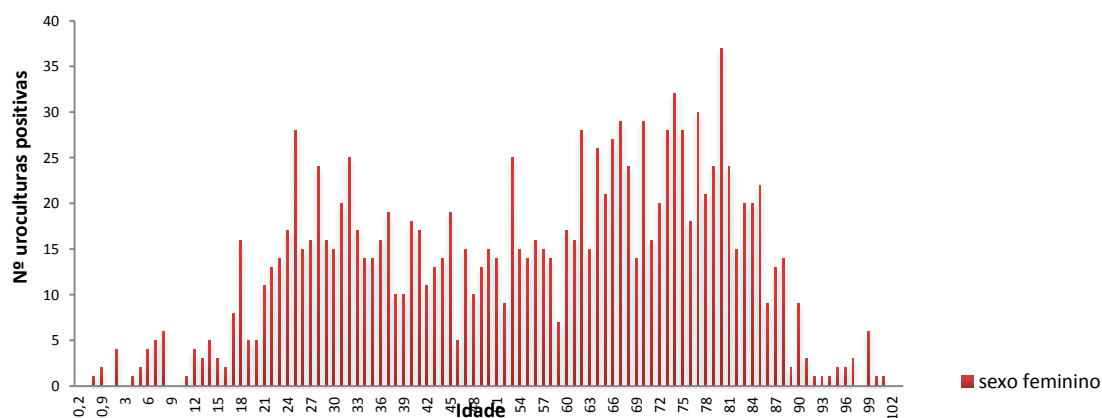


Figura 10 - Distribuição do número de uroculturas positivas em mulheres em função da idade (n= 1339)

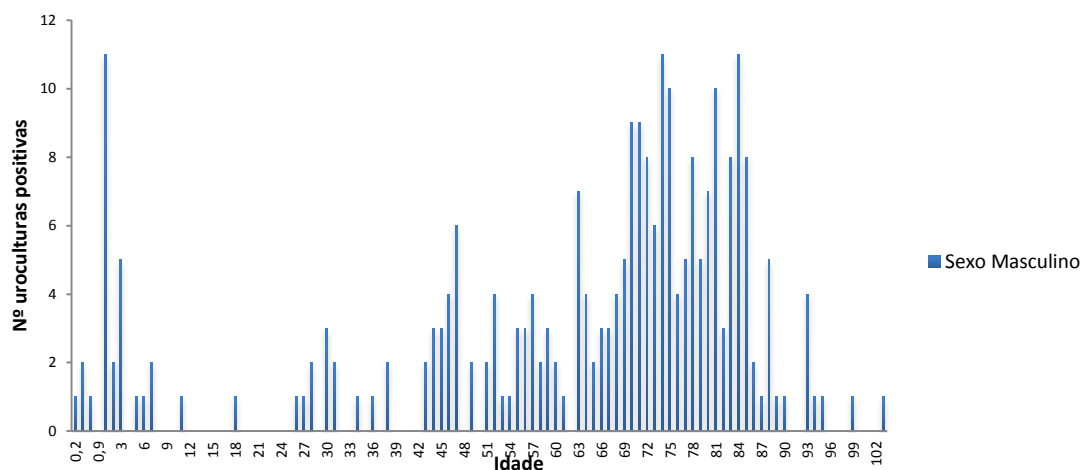


Figura 11 - Distribuição do número de uroculturas positivas em homens em função da idade (n= 255)

TABELA 18 – DISTRIBUIÇÃO DO Nº DE UROCULTURAS POSITIVAS EM FUNÇÃO DO GRUPO ETÁRIO E SEXO

Grupo etário (anos)	Total (n/%)	Sexo Feminino (n/%)	Sexo Masculino (n/%)
0-10	51/3,2	25/1,9	26/10,2
11-20	54/3,4	52/3,9	2/0,8
21-30	176/11,0	169/12,6	7/2,7
31-40	169/10,6	163/12,2	6/2,4
41-50	152/9,5	132/9,9	20/7,8
51-60	171/10,7	146/10,9	25/9,8
61-70	267/16,8	229/17,1	38/14,9
71-80	327/20,5	254/19	73/28,6
81-90	198/12,4	148/11,1	50/19,6
91-100	27/1,7	20/1,5	7/2,7
101-110	2/0,1	1/0,1	1/0,4

Na Tabela 19 estão sumarizadas as características dos pacientes com uroculturas positivas:

TABELA 19 – CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM INFECÇÃO URINÁRIA

Variáveis dos pacientes	Nº pacientes (n/%)
Idade, anos (mediana - intervalo)	62 (0-103)
Diabetes	211/ 13,2
História de ITU anterior	700/43,9
Grávidas	113/7,1
Hospitalizados	12/0,75
Lares	126/7,9

13,2% dos doentes com ITU eram diabéticos, 7,1% eram grávidas, 43,9% tinham história de infecções urinárias anteriores, 7,9% eram indivíduos em lares e 0,75% eram pacientes hospitalizados.

3.2. Agentes etiológicos

Das 1594 uroculturas com contagem de colónias significativa ($>10^5$ ufc/ml) foram isoladas 1410 bactérias de Gram negativo (88,5%), 166 bactérias de Gram positivo (10,4%) e 18 leveduras (1,1%). (Figura 12)

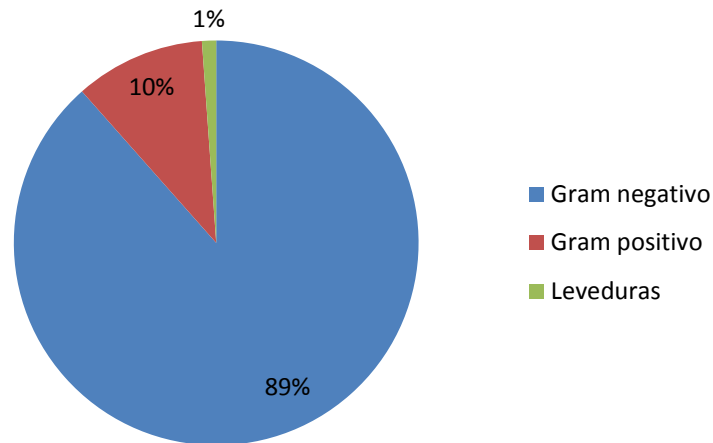


Figura 12 - Distribuição dos agentes etiológicos da ITU

Os agentes etiológicos isolados estão representados na tabela 20 e figura 13.

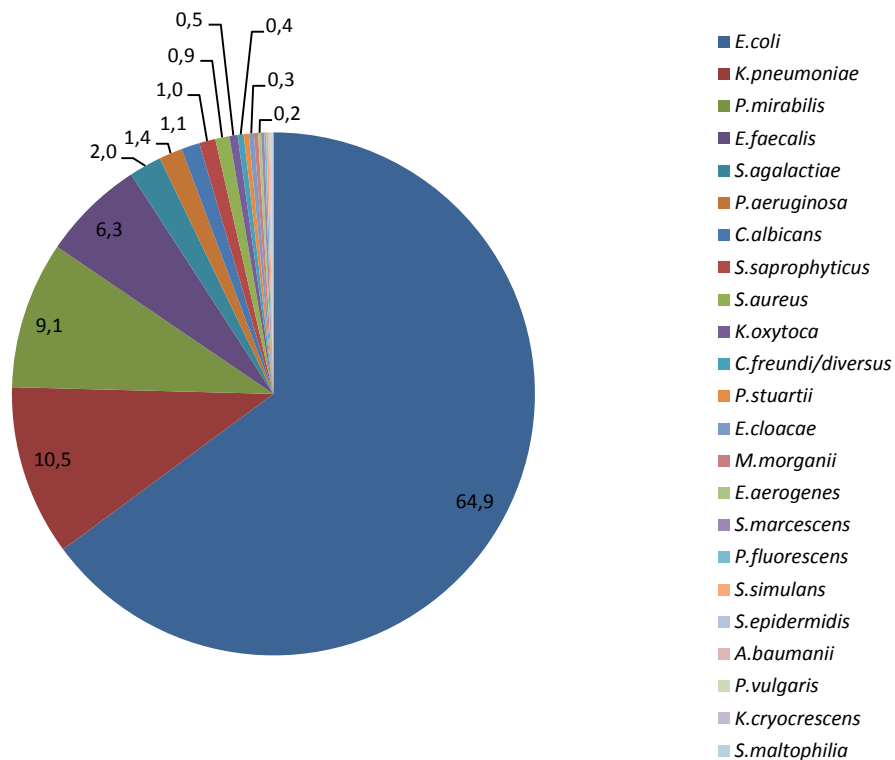


Figura 13 - Distribuição em percentagem dos agentes etiológicos da infecção urinária

TABELA 20 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS ISOLADAS COM MAIOR FREQUÊNCIA DE ACORDO COM O SEXO

Estirpe	Total	Sexo Masculino	Sexo Feminino
	n/%	n/%	n/%
<i>E. coli</i>	1034/64,9	121/47,5	913/68,2
<i>K. pneumoniae</i>	168/10,5	39/15,3	129/9,6
<i>P.mirabilis</i>	145/9,1	44/17,3	101/7,5
<i>E. faecalis</i>	101/6,3	18/7,1	83/6,2
<i>S.agalactiae</i>	32/2,0	3/1,2	29/2,2
<i>P.aeruginosa</i>	23/1,4	10/3,9	13/1
<i>C.albicans</i>	18/1,1	1/0,4	17/1,3
<i>S.saprophyticus</i>	16/1	2/0,8	14/1
<i>S.aureus</i>	14/0,9	5/2,0	9/0,7
<i>K.oxytoca</i>	8/0,5	2/0,8	6/0,4
<i>P.stuartii</i>	5/0,3	1/0,4	4/0,3
<i>E.cloacae</i>	5/0,3	-	5/0,4
<i>C.freundii</i>	5/0,3	1/0,4	4/0,3
<i>M.morganii</i>	4/0,3	3/1,2	1/0,1
<i>S.marcescens</i>	3/0,2	2/0,8	1/0,1
<i>E.aerogenes</i>	3/0,2	1/0,4	2/0,1
<i>S.simulans</i>	2/0,1	-	2/0,1
<i>P.fluorescens</i>	2/0,1	-	2/0,1
<i>S.maltophilia</i>	1/0,1	1/0,4	-
<i>S.epidermidis</i>	1/0,1	-	1/0,1
<i>P.vulgaris</i>	1/0,1	-	1/0,1
<i>K.cryocrescens</i>	1/0,1	-	1/0,1
<i>C.diversus</i>	1/0,1	-	1/0,1
<i>A.baumannii</i>	1/0,1	1/0,4	-

E.coli foi isolada em 64,9% das urinas, seguida por *K.pneumoniae* em 10,5% das urinas e *P.mirabilis* em 9,1% das urinas.

Dentro das bactérias de Gram positivo *E.faecalis* foi a espécie predominante, sendo isolado em 6,34 % das urinas, seguido por *S. agalactiae* (Grupo B), isolado em 6,3% das urinas.

O restante correspondia a outros uropatógenos habituais mas com frequências menores que 2%.

Em ambos os sexos *E.coli* foi o microorganismo isolado mais frequentemente se bem que em maior percentagem no sexo feminino do que no sexo masculino. *K.pneumoniae* e *P.mirabilis* foram os microorganismos mais vezes isolados a seguir à *E.coli*, com maior percentagem de isolamento nos homens do que nas mulheres. *K.pneumoniae* foi o segundo principal agente de ITU nas mulheres enquanto que nos homens foi o terceiro agente, a seguir a *P.mirabilis*.

3.2.1. *E.coli*

A distribuição dos isolados de *E.coli* está representada na tabela 21 e figura 14 e 15.

TABELA 21 - DISTRIBUIÇÃO DE <i>E.COLI</i> DE ACORDO COM O SEXO E GRUPO ETÁRIO		
Grupo etário (anos)	Sexo Feminino (n/%)	Sexo Masculino (n/%)
0-10	18/2,0	8/6,6
11-20	21/2,3	0/0,0
21-30	107/11,7	2/1,7
31-40	101/11,1	4/3,3
41-50	99/10,8	13/10,7
51-60	108/11,8	15/12,4
61-70	173/18,9	15/12,4
71-80	169/18,5	40/33,1
81-90	103/11,3	20/16,5
91-100	14/1,5	4/3,3

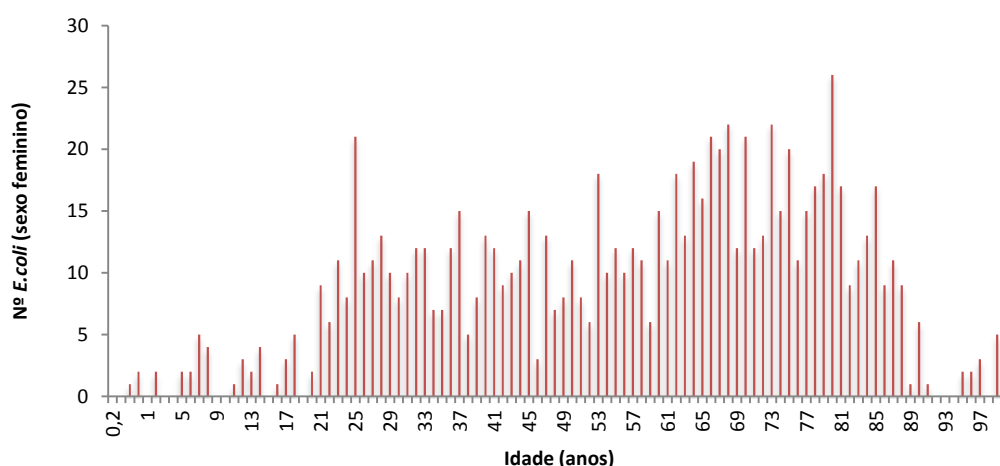


Figura 14 – Número de isolados de *E.coli* no sexo feminino por idade

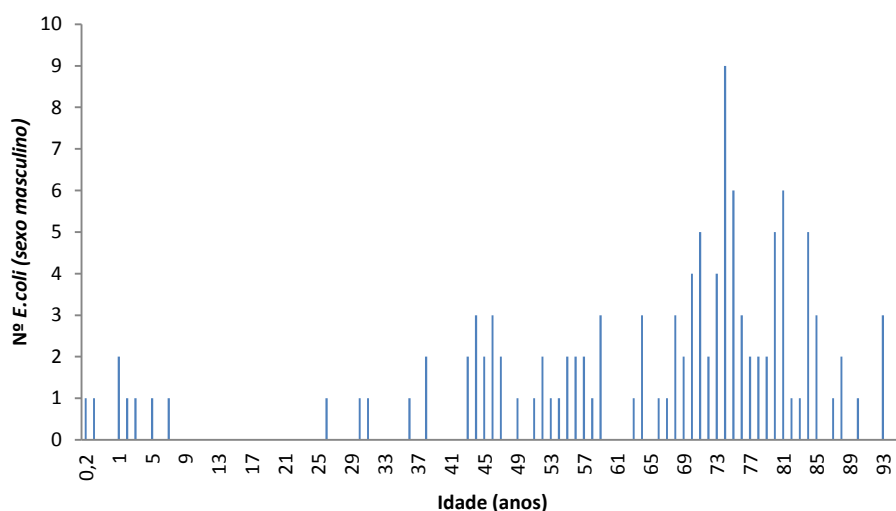


Figura 15 – Número de isolados de E.coli no sexo masculino por idade

A distribuição dos isolados de *E.coli* por sexo e idade segue o mesmo perfil que a distribuição das uroculturas positivas, com uma distribuição bimodal na mulher e nos homens com um predomínio em idades mais avançadas. Na mulher o pico da infecção encontra-se no grupo etário dos 61 aos 80 anos enquanto que nos homens este pico é para idades mais avançadas, dos 71 aos 90 anos. Nas crianças verifica-se uma maior percentagem de isolados nos meninos do que nas meninas.

3.2.2. *K.pneumoniae*

A distribuição dos isolados de *K.pneumoniae* está representada na tabela 22 e figura 16 e 17.

TABELA 22 - DISTRIBUIÇÃO DE <i>K.PNEUMONIAE</i> DE ACORDO COM O SEXO E GRUPO ETÁRIO		
Grupo etário (anos)	Sexo Feminino (n/%)	Sexo Masculino (n/%)
0-10	2/1,6	-
11-20	9/7,0	-
21-30	17/13,2	2/5,1
31-40	13/10,1	-
41-50	11/8,5	5/12,8
51-60	12/9,3	4/10,3
61-70	20/15,5	8/20,5
71-80	27/20,9	13/33,3
81-90	17/13,2	7/17,9
91-100	-	-
101-110	1/0,8	-

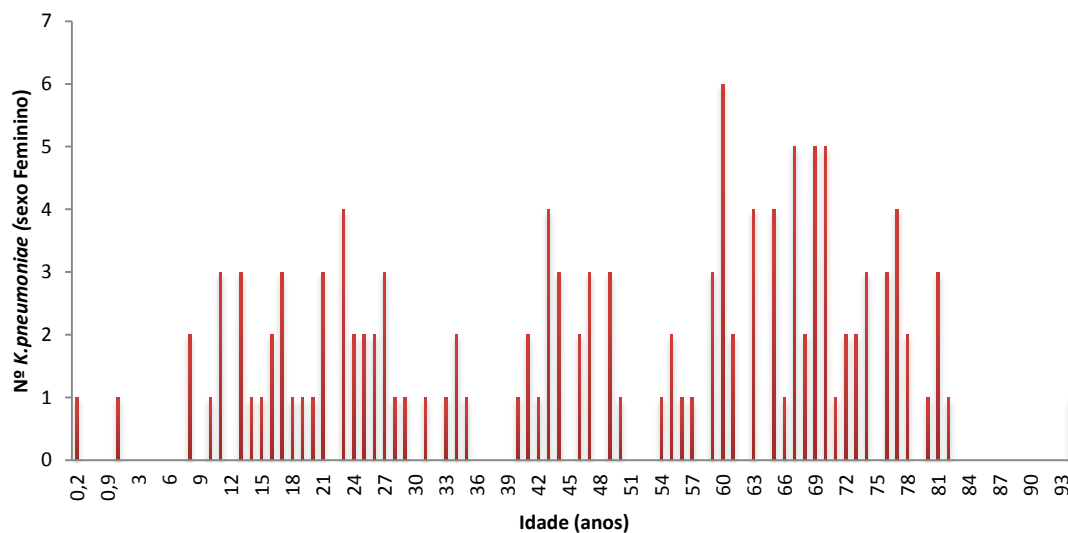


Figura 16 – Número de isolados de *K.pneumoniae* no sexo feminino por idade

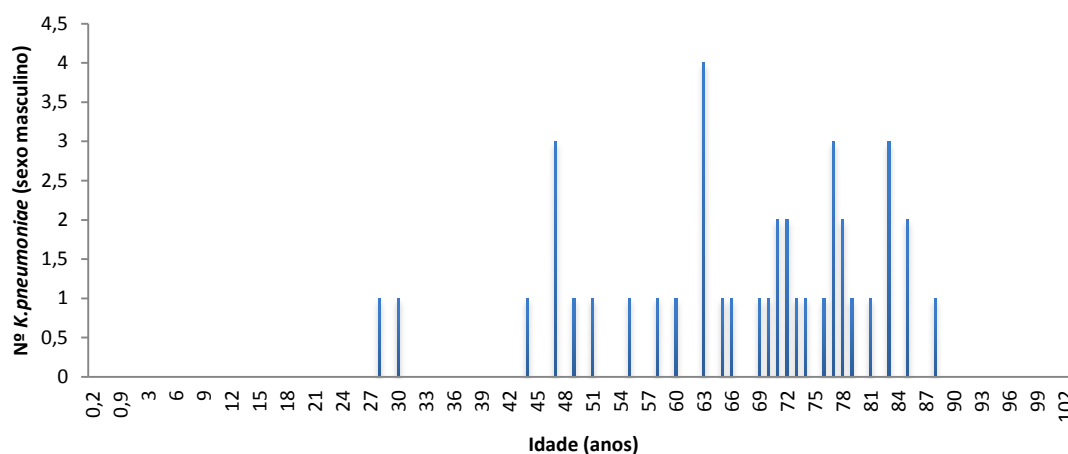


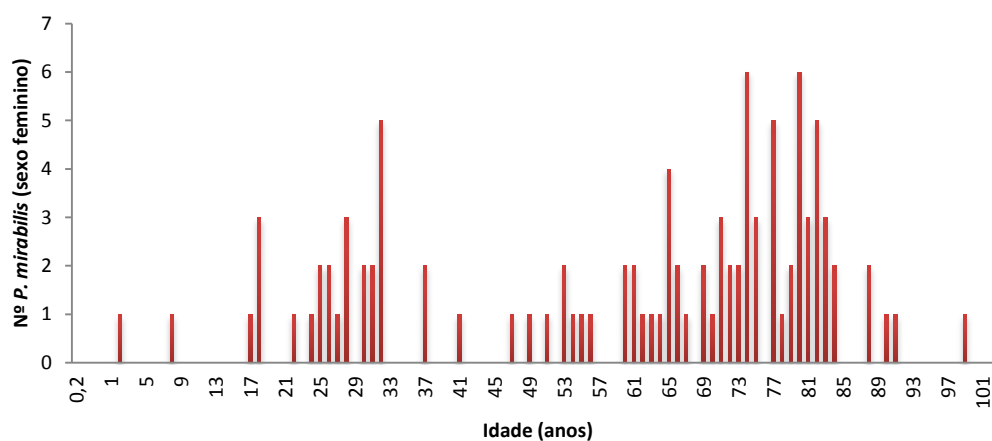
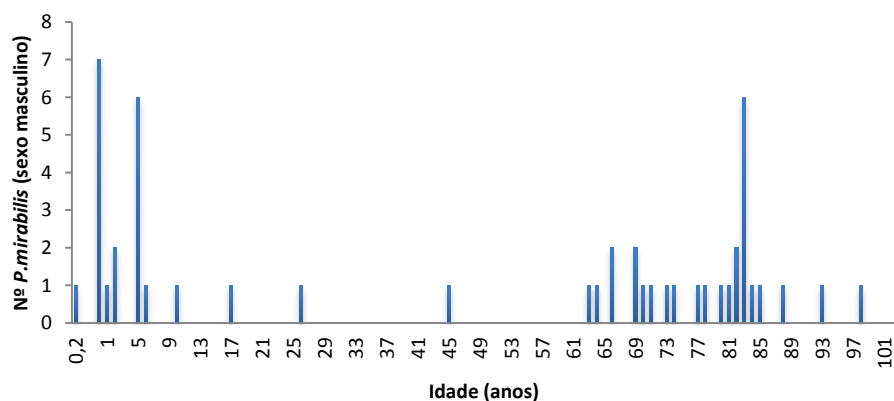
Figura 17 – Número de isolados de *K.pneumoniae* no sexo masculino por idade

Tal como para a *E.coli*, o pico da infecção por *K.pneumoniae* nas mulheres é dos 61 aos 80 anos. No homem é dos 61 aos 90 anos

3.2.3. *P.mirabilis*

A distribuição dos isolados de *P.mirabilis* está representada na tabela 23 e figura 18 e 19.

Grupo etário (anos)	Sexo Feminino (n/%)	Sexo Masculino (n/%)
0-10	2/2,0	13/29,5
11-20	4/4,0	2/4,5
21-30	12/11,9	1/2,3
31-40	9/8,9	-
41-50	3/3,0	1/2,3
51-60	8/7,9	-
61-70	15/14,9	6/13,6
71-80	30/29,7	6/13,6
81-90	16/15,8	13/29,5
91-100	2/2,0	2/4,5
101-110	-	-

Figura 18– Número de isolados de *P.mirabilis* no sexo feminino por idadeFigura 19 – Número de isolados de *P.mirabilis* no sexo masculino por idade

Nas mulheres *P.mirabilis* foi encontrado em maior percentagem entre os 61 e os 90 anos, com um pico entre os 71 e os 80 anos. Nos homens encontram-se dois picos distintos para infecção por *P.mirabilis*. Um pico nas crianças ao contrário do que se passa com os outros dois agentes etiológicos e um outro pico dos 81 aos 90 anos.

3.2.4. *E.faecalis*

A distribuição dos isolados de *E.faecalis* está representada na tabela 24 e figura 20 e 21.

TABELA 24- DISTRIBUIÇÃO DE <i>E.FAECALIS</i> DE ACORDO COM O SEXO E GRUPO ETÁRIO		
Grupo etário (anos)	Sexo Feminino (n/%)	Sexo Masculino (n/%)
0-10	2/2,4	3/16,7
11-20	8/9,6	-
21-30	17/20,5	-
31-40	20/24,1	-
41-50	11/13,3	-
51-60	8/9,6	2/11,1
61-70	11/13,3	4/22,2
71-80	5/6,0	6/33,3
81-90	1/1,2	3/16,7
91-100	-	-
101-110	-	-

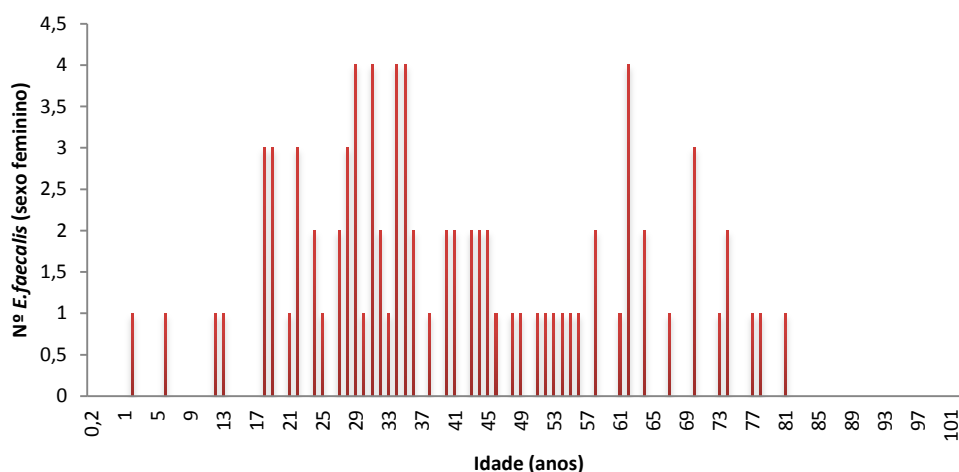


Figura 20 – Número de isolados de *E. faecalis* no sexo feminino por idade

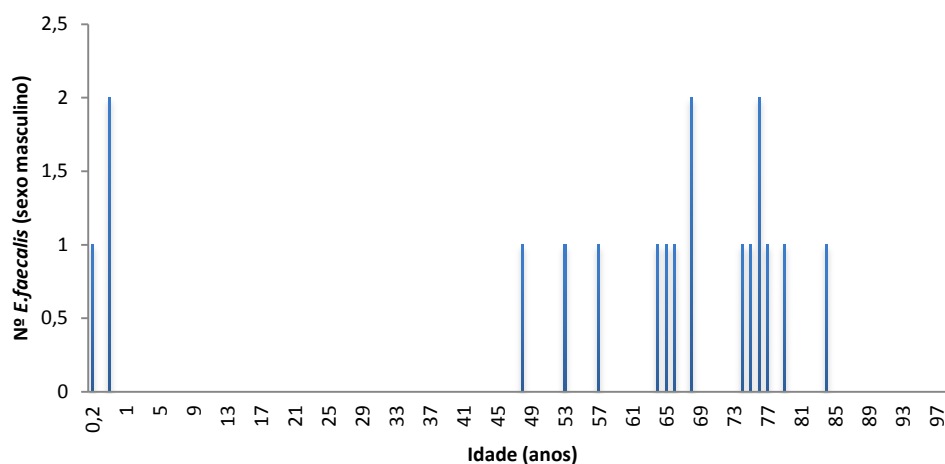


Figura 21 – Número de isolados de *E. faecalis* no sexo masculino por idade

Os isolados de *E. faecalis* encontram-se em mulheres mais jovens dos 21 aos 40 anos. No homem isolaram-se principalmente entre os 61 e os 80 anos

3.3. ITU na mulher grávida

Foram analisadas 1343 urinas provenientes de mulheres grávidas. Em 8,4% foi isolado um agente etiológico. Das urinas onde foi isolado um agente etiológico 29,2% provinham de grávidas com história de infeções urinárias anteriores. A distribuição dos agentes etiológicos está representada na tabela 25 e figura 22.

TABELA 25 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS ISOLADAS NA GRÁVIDA	
Estirpe	n/%
<i>E. coli</i>	53/46,9
<i>E. faecalis</i>	26/23
<i>K. pneumoniae</i>	8/7,1
<i>C. albicans</i>	8/7,1
<i>P. mirabilis</i>	7/6,2
<i>S. agalactiae</i>	4/3,5
<i>S. saprophyticus</i>	2/1,8
<i>S. aureus</i>	2/1,8
<i>E. cloacae</i>	2/1,8
<i>S. simulans</i>	1/0,9

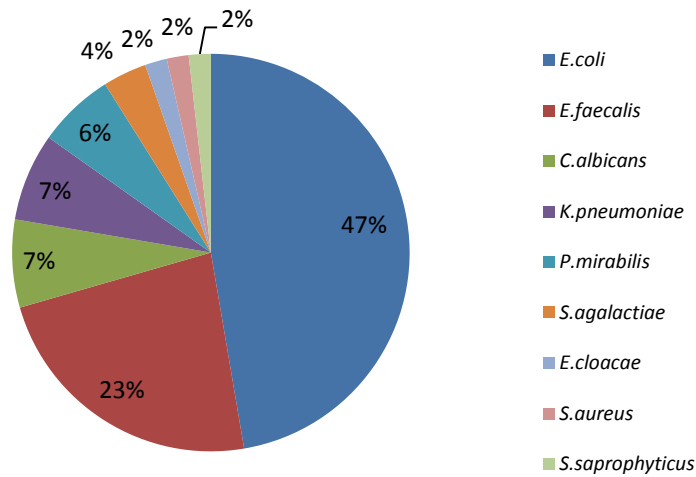


Figura 22 – Distribuição dos agentes etiológicos da infecção urinária na mulher grávida

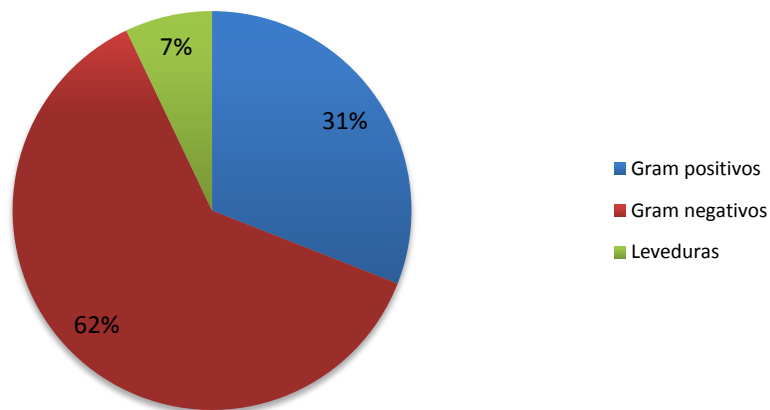


Figura 23 – Distribuição dos agentes etiológicos da infecção urinária na mulher grávida

Na mulher grávida a percentagem de isolamento de Gram negativos é bastante inferior ao encontrado no total das mulheres (62% vs. 89%), sucedendo o contrário relativamente aos Gram positivos (31% vs. 10%) e às leveduras (7% vs. 5%).

Verifica-se na mulher grávida uma percentagem de isolamento de *E.coli* bastante inferior ao encontrado no total dos isolados 47% vs. 68,2%. Na mulher grávida *Enterococcus faecalis* é o segundo agente etiológico, presente em 23% das uroculturas e *Candida albicans* o terceiro juntamente com *K.pneumoniae*, ambos os agentes isolados em 7% das urinas.

3.4. ITU em diabéticos

Nos diabéticos a distribuição dos agentes etiológicos foi a seguinte:

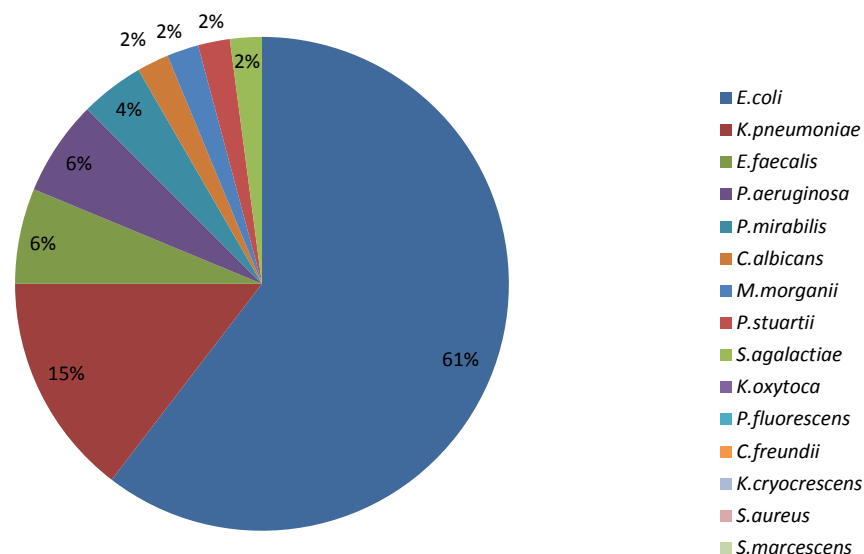


Figura 24 – Distribuição dos agentes etiológicos da infecção urinária em diabéticos do sexo masculino.

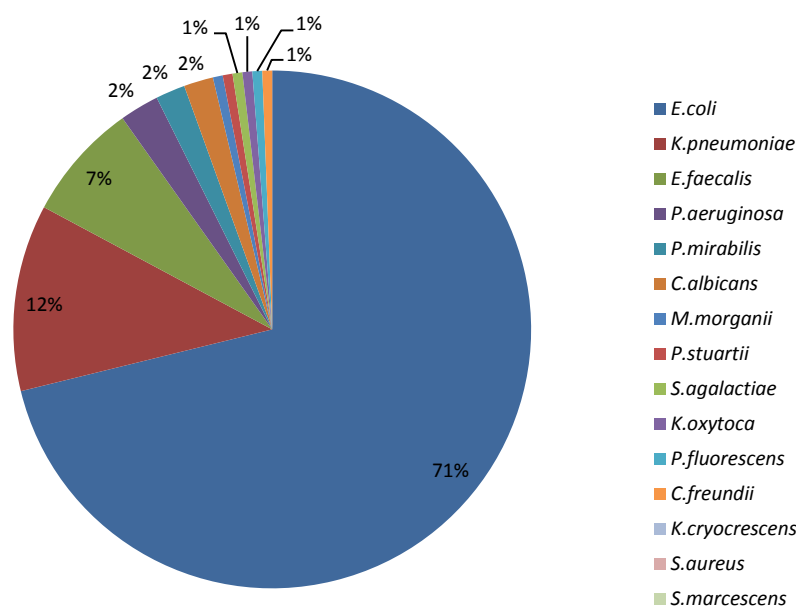


Figura 25 – Distribuição dos agentes etiológicos na infecção urinária em diabético do sexo feminino.

Tal como nos outros grupos estudados, *E. coli* foi o principal agente isolado nos diabéticos. Verifica-se que a percentagem de isolamento de *E. coli* foi superior nas mulheres diabéticas do que nos homens diabéticos (71% vs. 61%). *K. pneumoniae* por outro lado teve uma maior percentagem de isolamento nos homens diabéticos (15% vs. 12%). O terceiro agente isolado foi em ambos os casos *E. faecalis* contrariamente ao

que acontece com a restante população em que *P.mirabilis* é o terceiro agente. A percentagem de isolamento de *P.aeruginosa* foi também superior neste grupo.

3.5. ITU em lares

Nos indivíduos institucionalizados em lares a distribuição dos agentes etiológicos foi a seguinte:

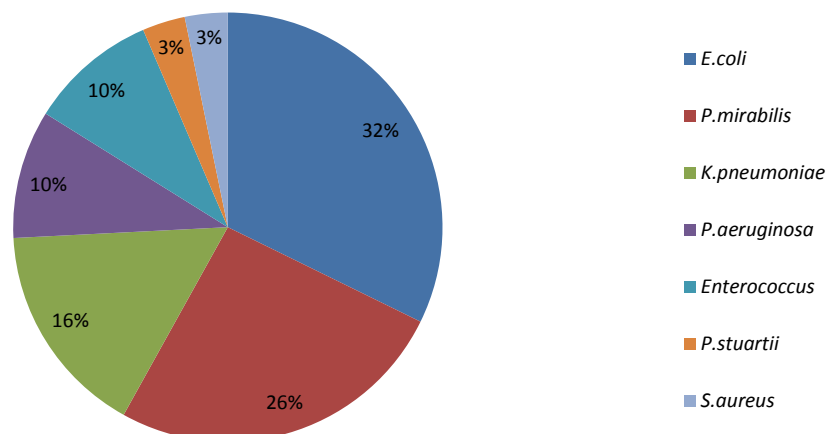


Figura 26– distribuição dos agentes etiológicos na infecção urinária em pacientes provenientes de lares – sexo masculino

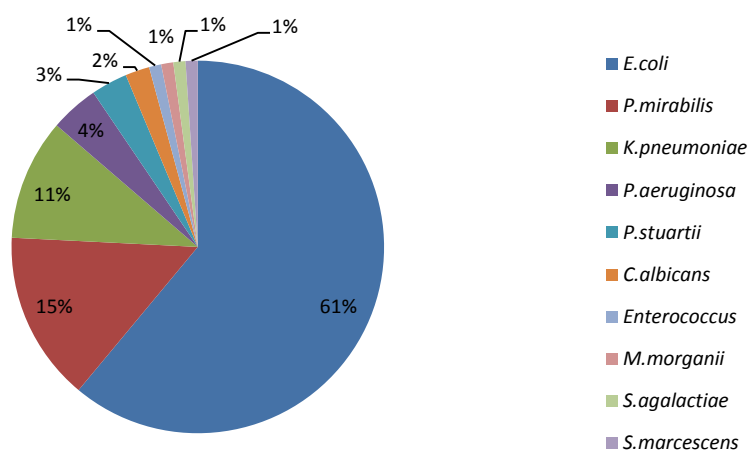


Figura 27 – distribuição dos agentes etiológicos na infecção urinária em pacientes provenientes de lares – sexo feminino

Verifica-se tal como nos outros grupos estudados o predomínio da infecção por *E.coli*, seguida por *P.mirabilis* e *K.pneumoniae*. Neste grupo da população verifica-se uma maior percentagem de isolamento de *P.aeruginosa*. Os pacientes são geralmente muito idosos, encontrando-se com um estado geral de saúde debilitado e muitas vezes algaliados o que contribui para o aparecimento desta espécie.

3.6. Resistências aos antibióticos

Dos 1594 isolados, 46,1% eram sensíveis a todos os antibióticos testados. 53,9% das estirpes isoladas apresentava pelo menos resistência a um dos antibióticos testados.

A taxa de resistência encontrada no sexo masculino foi superior à encontrada no sexo feminino. 62,4% das estirpes isoladas de urinas de indivíduos do sexo masculino apresentavam resistência a pelo menos um dos antibióticos. Nos isolados provenientes de urinas de indivíduos do sexo feminino esse valor foi de 52,3%.

A tabela 26 mostra as percentagens de resistência *in vitro* dos três principais microrganismos isolados, *E.coli*, *K.pneumoniae* e *P.mirabilis*, para os antibióticos mais comumente utilizados no tratamento da ITU. A figura 28 apresenta a mesma informação em forma de gráfico.

TABELA 26 – RESISTÊNCIAS DE *E.COLI*, *K.PNEUMONIAE* E *P.MIRABILIS* AOS ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA ITU

Antibióticos	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.mirabilis</i>
	Nº isolados resistentes (n/%)	Nº isolados resistentes (n/%)	Nº isolados resistentes (n/%)
Amoxicilina (AMX)	426 41,2%	168 100% (R natural)	60 41,4%
Amoxicilina + ácido clavulânico (AMC)	56 5,4%	18 10,7%	21 14,5%
Cefalotina (CF)	176 17%	32 19%	33 22,8%
Cefuroxima (CXM)	69 6,7%	16 9,5%	11 7,6%
Cefoxitina (FOX)	21 2,0%	15 8,9%	3 2,1%
Ceftazidima (CAZ)	28 2,7%	5 2,9%	3 2,1%
Cefotaxima (CTX)	33 3,2%	3 1,8%	5 3,4%
Norfloxacina (NOR)	206 19,9%	39 23,2%	30 20,7%
Ciprofloxacina (CIP)	104 10%	19 11,3%	15 10,3%
Trimetoprim + sulfametoxazol (SXT)	282 27,3%	33 19,6%	43 29,7%
Nitrofurantoína (FN)	30 2,9%	45 27%	145 100% (R natural)
Fosfomicina (F)	15 1,5%	4 2,4%	4 2,8%
Gentamicina (G)	57 5,5%	9 5,4%	23 15,9%
Tobramicina (T)	48 4,6%	7 4,2%	14 9,7%

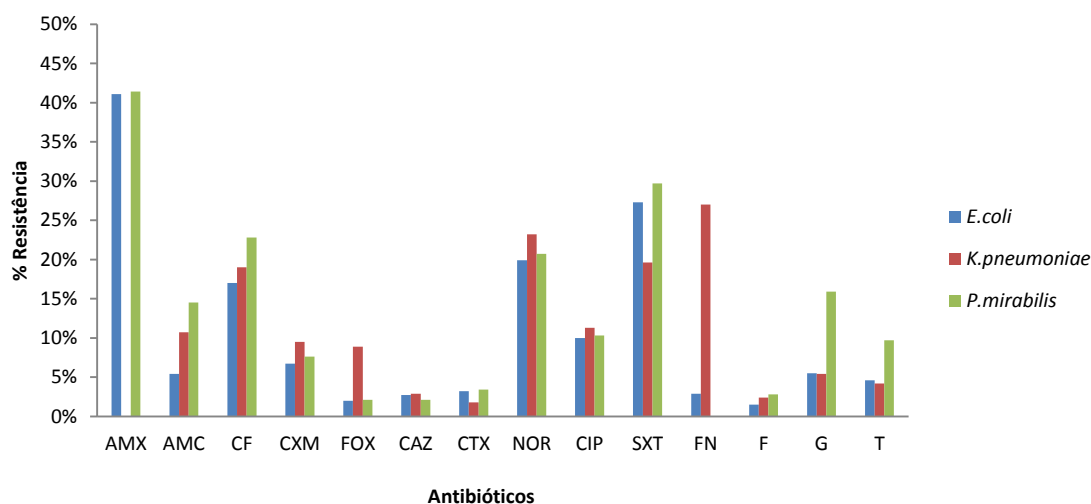


Figura 28 – Percentagem de resistências observadas nos principais microorganismos isolados

41,2 % das estirpes de *E. coli* eram resistentes à AMX, 27,3% ao SXT, 19,9% à NOR, 17% a cefalosporinas de 1ª geração e 10 % à CIP. 6,7% das estirpes de *E. coli* eram resistentes à CXM e 5,4% à AMC. Apenas cerca de 3% dos isolados apresentava resistência às cefalosporinas de 3ª geração (3,2% à CTX e 2,7% à CAZ). Dentro dos antibióticos utilizados por via oral os níveis de resistência mais baixos foram encontrados na nitrofurantoína (2,9%) e fosfomicina (1,5%). Outros antibióticos tiveram também baixas taxas de resistência mas não são utilizados comumente no tratamento das infecções urinárias adquiridas na comunidade em virtude da sua via de administração não ser oral mas sim parentérica.

Das 426 estirpes resistentes à AMX, 22,5% apresentava resistência só a esse antibiótico, 55,2% eram resistentes também ao SXT, 39,9% à NOR, 33,1% às cefalosporinas de 1ª geração, 20,7% à CIP, 13,1% à AMC e 12,4% à CXM.

28,6% das estirpes eram resistentes simultaneamente à AMX, SXT e NOR. 21,1% era resistente simultaneamente à AMX, SXT e CF, 15,5% à AMX, SXT, CF e NOR, 14,8% à AMX, SXT, NOR e CIP e 8,9% à AMX, SXT, CF, NOR e CIP. 5,9% apresentava resistência simultânea à AMX, SXT, NOR, CIP, CF e CXM e 2,3% apresentava resistência à AMX, AMC, CF, CXM, NOR, CIP e SXT.

Relativamente às cefalosporinas de 3ª geração, 7,5% das estirpes resistentes à AMX também o são à CTX, 6,6% à CAZ e 6,3% aos três antibióticos em simultâneo.

27 % das estirpes de *K. pneumoniae* eram resistentes à FN, 23,2% à NOR, 19,6% ao SXT, 19% às cefalosporinas de 1ª geração e 11,3 % à CIP. 9,5% das estirpes de *K. pneumoniae* eram resistentes à CXM e 10,7% à AMC. Dentro dos antibióticos por via oral os níveis de resistência mais baixos foram encontrados fosfomicina (2,4%). A taxa de resistências a cefalosporinas de 2ª e 3ª geração foi inferior a 3% em *K. pneumoniae*, havendo no entanto uma maior percentagem de isolados resistentes à CAZ do que à CTX contrariamente ao verificado nas estirpes de *E. coli*.

A percentagem de isolados resistentes à FN é bastante superior ao encontrado em *E.coli*, sendo este um antibiótico a evitar nas infecções por *K.pneumoniae*.

A percentagem de resistência às quinolonas também é considerável – 23,2 % das estirpes eram resistentes à NOR, um valor superior ao encontrado nas estirpes de *E.coli*.

Das 45 estirpes de *K.pneumoniae* resistentes à FN 31,1% eram resistentes apenas a esse antibiótico. 64,4% também o eram à NOR, 48,9% ao SXT, 33,3% à CIP e 28,9 à CF e 17,8% à AMC. 22,2% eram resistentes simultaneamente à FN, NOR, CIP e SXT, 11,1% eram resistentes à FN, NOR, CIP, SXT e CF e 8,9% eram resistentes simultaneamente aos 6 antibióticos.

41,4 % das estirpes de *P.mirabilis* eram resistentes à AMX, 29,7% ao SXT, 22,8% a cefalosporinas de 1ª geração, 20,7% à NOR e 10,3 % à CIP. 14,5% das estirpes de *P.mirabilis* eram resistentes à AMC. Dentro dos antibióticos por via oral os níveis de resistência mais baixos foram encontrados na fosfomicina (2,8%).

Das 60 estirpes de *P.mirabilis* resistentes à AMX, 55% também o era ao SXT, 41,7% às cefalosporinas de 1ª geração, 36,7% à NOR, 33,3% à AMC e 20% à CIP. 15% eram resistentes simultaneamente à AMX, SXT e CF. 10% eram resistentes simultaneamente à AMX, SXT, CF e NOR. 3,3% eram resistentes simultaneamente à AMX, AMC, CF, NOR, CIP e SXT.

Observou-se uma taxa de resistência às quinolonas de cerca de 20% nos três géneros.

3.7. Caracterização da amostra – 2ª Parte

Durante o ano de 2011 foram seleccionadas 60 estirpes bacterianas, isoladas de urinas, que apresentavam resistência a pelo menos um dos antibióticos testados e 49 estirpes sensíveis a todos os antibióticos.

Relativamente às estirpes com resistências, foram isoladas 42 *E.coli*, 17 *K.pneumoniae* e 1 *P.aeruginosa*. 47 estirpes foram isoladas de utentes do sexo feminino e 13 de utentes do sexo masculino.

Relativamente às estirpes sensíveis foram isoladas 43 *E.coli* e 6 *K.pneumoniae*. 45 foram isoladas de utentes do sexo feminino e 4 de utentes do sexo masculino.

As idades dos utentes estavam compreendidas entre os 4 e os 101 anos. 7 eram grávidas, 11 eram diabéticos, 9 eram provenientes de lares e 72 tinham história de infecções urinárias anteriores. 1 utente encontrava-se algaliado.

TABELA 27 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Variáveis dos pacientes	Estirpes Resistentes	Estirpes sensíveis
	Nº pacientes (%)	Nº pacientes (%)
Idade, anos mediana (intervalo)	48 (4-101)	55,5 (7-84)
Diabetes	7	4
História de ITU anterior	30	42
Grávidas	5	2
Lares	8	1

3.8. Antibiogramas

Os antibiogramas das amostras resistentes estão apresentado na tabela 28. São apresentadas as CMI e a interpretação efectuada com base nas normas da CLSI de 2010.

Resultados

TABELA 28 – ANTIBIOGRAMA DAS AMOSTRAS ANALISADAS																						
Nº	Sexo	Idade	Estirpe	AMX ^(*)	AMC	CF	CXM	FOX	CTX	CAZ	CEF	ERT	IMI	AMI	G	T	NA	NOR ⁺	CIP	F	FN	SXT
1	F	86	<i>E.coli</i>	≥32	8	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320
3	F	90	<i>E.coli</i>	≥32	8	≥64	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≥16	4	≥32	R	2	≤16	64	≥320
4	F	32	<i>E.coli</i>	≥32	8	≥64	≥64	≤4	≥64	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≥16	8	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≤20
6	F	79	<i>E.coli</i>	≥32	≥32	≥64	≥64	≤4	4	≤1	≤1	≤0,5	≤1	16	2	≥16	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320
7	F	48	<i>E.coli</i>	≥32	8	32	16	16	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≥16	8	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320
8	F	56	<i>E.coli</i>	≥32	16	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	4	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≤16	≤16	≥320
9	F	30	<i>E.coli</i>	≥32	8	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	4	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≤16	≤16	≥320
10	F	44	<i>E.coli</i>	≥32	8	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≤0,25	≤16	≤16	≥320
11	F	42	<i>E.coli</i>	≥32	16	32	8	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	4	S	≤0,25	≤16	≤16	≥320
12	F	37	<i>E.coli</i>	≥32	8	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	4	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≤16	32	≥320
13	F	11	<i>E.coli</i>	≥32	8	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	4	≤1	≤1	≥32	R	0,5	32	≤16	≥320
15	F	23	<i>E.coli</i>	≥32	4	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≤16	64	≥320
16	F	48	<i>E.coli</i>	≥32	4	32	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≤16	≤16	≤20
17	F	24	<i>E.coli</i>	≥32	8	32	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	4	≤1	≤1	≥32	R	1	≤16	≤16	≥320
18	F	23	<i>E.coli</i>	≥32	8	8	≤1	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≤16	64	≥320
19	F	56	<i>E.coli</i>	≥32	8	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	64	≥320
21	F	43	<i>E.coli</i>	≥32	16	16	32	16	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320

TABELA 28 – ANTIBIOGRAMA DAS AMOSTRAS ANALISADAS																						
Nº	Sexo	Idade	Estirpe	AMX ⁽¹⁾	AMC	CF	CXM	FOX	CTX	CAZ	CEF	ERT	IMI	AMI	G	T	NA	NOR ⁺	CIP	F	FN	SXT
23	F	61	<i>E.coli</i>	≥32	≥32	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≥16	≥16	≥32	R	≤0,25	≤16	≤16	≤20
24	M	85	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	8	≥64	16	≤4	≥64	≥64	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	128	≥320
26	F	26	<i>E.coli</i>	≥32	≥32	≥64	≥64	8	≥64	16	8	≤0,5	≤1	4	≤1	≥16	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320
27	F	43	<i>E.coli</i>	≥32	16	32	8	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	4	S	≤0,25	≤16	64	≤20
28	F	61	<i>E.coli</i>	≥32	8	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	2	≤16	≤16	≥320
29	F	24	<i>E.coli</i>	≥32	8	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≤0,25	≤16	≤16	≥320
30	F	40	<i>E.coli</i>	≥32	8	32	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	0,5	≤16	≤16	≤20
31	F	31	<i>E.coli</i>	≥32	8	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	2	≤16	≤16	≥320
32	F	30	<i>E.coli</i>	≥32	8	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320
33	F	38	<i>E.coli</i>	≥32	8	32	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≥16	8	≥32	R	0,5	32	≤16	≥320
34	M	66	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	4	≥64	≥64	≤4	≥64	16	32	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	256	≤20
35	F	34	<i>E.coli</i>	≥32	4	32	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320
36	M	79	<i>E.coli</i>	≥32	16	≥64	≥64	8	4	≤1	≤1	≤0,5	≤1	16	≤1	≥16	≥32	R	≥4	≤16	≤16	40
37	F	23	<i>E.coli</i>	≥32	4	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≤16	64	≥320
38	F	81	<i>E.coli</i>	≥32	16	≥64	32	32	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	4	≥16	8	≥32	R	≥4	≤16	64	≥320
39	F	49	<i>E.coli</i>	4	4	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≤20
40	M	66	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	8	≥64	≥64	≤4	≥64	16	4	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	64	128	80
41	M	75	<i>E.coli</i>	≥32	4	≥64	≥64	≤4	16	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	64	≥320

TABELA 28 – ANTIBIOGRAMA DAS AMOSTRAS ANALISADAS																						
Nº	Sexo	Idade	Estirpe	AMX ⁽¹⁾	AMC	CF	CXM	FOX	CTX	CAZ	CEF	ERT	IMI	AMI	G	T	NA	NOR ⁺	CIP	F	FN	SXT
42	M	57	<i>E.coli</i>	≥32	8	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≥16	8	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320
43	F	26	<i>E.coli</i>	≥16	≥32	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	8	S	≤0,25	≤16	128	≤20
44	F	62	<i>E.coli</i>	≥32	16	≥64	8	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	4	S	≤0,25	≤16	≤16	≥320
45	F	31	<i>E.coli</i>	≥32	8	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	4	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≤16	≤16	≥320
46	F	101	<i>E.coli</i>	≥32	4	≥64	32	8	4	16	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	64	40
47	F	74	<i>E.coli</i>	≥32	4	16	8	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	32	≤20
49	F	38	<i>E.coli</i>	≤2	≤2	4	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	128	≤16	≤20
50	M	64	<i>E.coli</i>	≥32	4	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≥320
51	F	60	<i>E.coli</i>	≥32	16	16	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	16	≤1	≥16	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≤20
52	F	83	<i>E.coli</i>	≥32	16	≥64	≥64	16	≥64	≥64	16	≤0,5	≤1	16	≤1	≥16	≥32	R	≥4	128	≤16	≤20
53	F	83	<i>E.coli</i>	≥32	8	≥64	≥64	≤4	≥64	4	2	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	≤16	≤20
54	M	36	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	≥32	≥64	16	32	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	8	≤1	≥16	≥32	R	≥4	32	≥512	≥320
55	F	70	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	≥32	≥64	≥64	≤4	≥64	≥64	32	≤0,5	≤1	16	≥16	≥16	≥32	R	≥4	≥256	128	≥320
56	F	71	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	8	8	4	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	8	S	1	≤16	64	≥320
57	F	82	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	16	16	16	8	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≥32	R	≥4	≤16	256	≥320
58	F	31	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤0,5	≤1	4	≤1	≥16	16	R	2	≤16	128	≥320
59	M	37	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	16	≥64	32	≥64	≤1	4	≤1	≤0,5	≤1	16	≤1	≥16	≥32	R	≥4	≤16	≥512	≥320
60	F	48	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	8	8	2	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	8	S	≤0,25	32	128	≤20

TABELA 28 – ANTIBIOGRAMA DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Nº	Sexo	Idade	Estirpe	AMX ^(*)	AMC	CF	CXM	FOX	CTX	CAZ	CEF	ERT	IMI	AMI	G	T	NA	NOR ⁺	CIP	F	FN	SXT
61	M	82	<i>K. pneumoniae</i>	16	≤2	≤2	≤1	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	≤2	S	≤0,25	≥256	32	≤20
62	F	56	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	4	4	2	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	8	S	≤0,25	64	128	≥320
63	F	27	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	≤2	≤2	2	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	8	S	≤0,25	32	128	≤20
65	F	94	<i>K. pneumoniae</i>	16	≤2	≤2	≤1	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	4	S	≤0,25	≥256	64	≤20
67	M	48	<i>K. pneumoniae</i>	16	≤2	≤2	2	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	8	S	≤0,25	32	64	80
69	M	75	<i>K. pneumoniae</i>	≥32	4	4	2	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,5	≤1	≤2	≤1	≤1	8	S	≤0,25	≥256	128	≤20

Nº	Sexo	Idade	Estirpe	TIC	TIC/AC	PIP	PIP/TAZ	CAZ	CEF	ATM	IMI	MER	AMI	G	ISE	T	CIP	PEF	MIN	COL	SXT
14	M	85	<i>P.aeruginosa</i>	≥128	≥128	32	32	16	16	≥64	≥16	≥16	≤2	2	4	≤1	≥4	≥16	≥16	≤0,5	≥320

Legenda: Sensíveis Intermédios Resistentes (CLSI 2010)

^(*) resultado deduzido da Ampicilina

+ Resultado deduzido pelo Vitek com base nos resultados do ácido nalidíxico e ciprofloxacina

95% das 42 estirpes de *E.coli* analisadas eram resistentes à AMX, 72,5% eram resistentes simultaneamente à AMX e ao SXT, 72,5% eram resistentes simultaneamente à AMX e NOR, 50% eram resistentes simultaneamente à AMX, SXT e NOR, e 30% apresentava resistência simultânea à AMX, SXT, NOR e CIP. 22,5% apresentava susceptibilidade reduzida à AMC e 7,5% apresentava resistência. Apenas 1 estirpe apresentava resistência à FOX e três apresentavam susceptibilidade reduzida à FOX. Relativamente às cefalosporinas de terceira geração 20% das estirpes apresentavam resistência à CTX e 7,5% à CAZ e CTX simultaneamente.

De todas as estirpes de *E.coli* analisadas apenas 2 apresentavam resistência à fosfomicina.

Das 30 estirpes resistentes à NOR, 12 eram também resistentes a pelo menos um aminoglicosídeo.

Das 17 *K.pneumoniae* analisadas 4 apresentavam resistência à AMC e 2 apresentavam susceptibilidade reduzida. 4 estirpes apresentavam resistência à fosfomicina. 10 apresentavam resistência ao SXT e 9 às quinolonas NOR e CIP. Destas, 4 apresentavam também resistência a pelo menos um aminoglicosídeo. 3 estirpes eram resistentes à FOX, 5 à CTX e 3 simultaneamente à CAZ e CTX. 1 estirpe apresentava resistência às três cefalosporinas em simultâneo.

3.9. Pesquisa de β -lactamases

3.9.1. Pesquisa de metalo- β -lactamases

A única amostra testada com resistência aos carbapenemos foi a amostra 14 – *Pseudomonas aeruginosa*. Efectuou-se o teste de inibição com EDTA para verificar se essa resistência era devida à presença de metalo- β -lactamases. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 29 e figura 29.



TABELA 29 – TESTE DE INIBIÇÃO COM EDTA		
Antibiótico	Halo (mm)	
	Sem EDTA	Com EDTA
Imipenem	9	9
Aztreonam	18	18
Ticarcilina	15	14

Figura 29 – Amostra 14 – *Pseudomonas aeruginosa* - Resultado do teste de inibição com EDTA

Não se verificou diferença nos halos dos discos de antibióticos com e sem EDTA por isso a amostra não apresenta metalo- β -lactamase e a resistência aos carbapenemos é devida a outro mecanismo de resistência diferente.

3.9.2. Pesquisa de β -lactamases AmpC

Nas amostras nºs 38, 52 e 54 que apresentavam resistência ou susceptibilidade reduzida ao AMC e à FOX efectuou-se o teste de inibição com a cloxacilina para verificar a possível existência de uma β -lactamase AmpC. O fenótipo AmpC é caracterizado pela resistência à AMC, pois não são inibidas pelos inibidores das β -lactamases, e resistência à cefoxitina. Os resultados estão apresentados na tabela 30 e figura 30.

TABELA 30 – TESTE DE INIBIÇÃO COM CLOXACILINA

Antibiótico	Amostra 38 (<i>E.coli</i>) Halo (mm)		Amostra 52 (<i>E.coli</i>) Halo (mm)		Amostra 54 (<i>K.pneumoniae</i>) Halo (mm)	
	Sem cloxacilina	Com cloxacilina	Sem cloxacilina	Com cloxacilina	Sem cloxacilina	Com cloxacilina
Cefoxitina	15	16	20	22	0	13
Cefotaxima	28	29	0	0	17	19
Ceftazidima	26	26	12	13	17	19

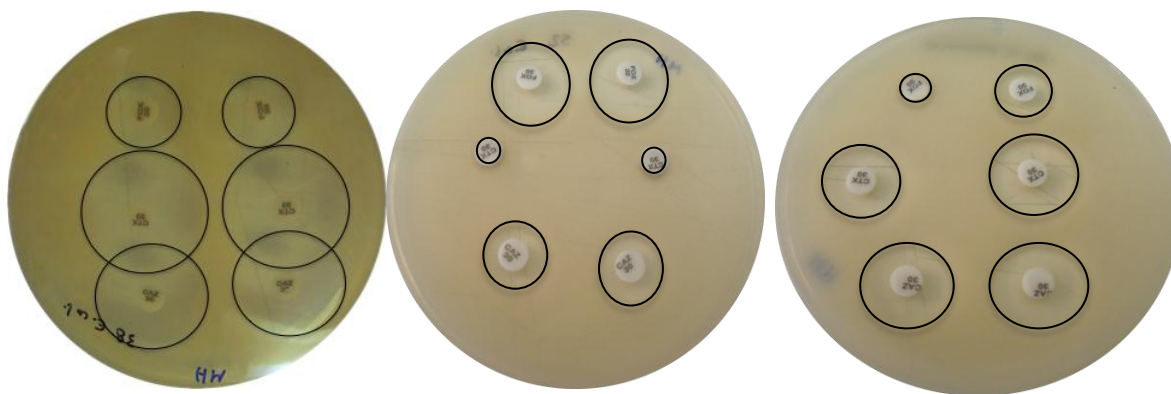


Figura 30 – Resultado do teste de inibição com cloxacilina - Amostra 38 – *E.coli* (esquerda), Amostra 52 – *E.coli* (centro) e Amostra 54 – *K.pneumoniae* (direita)

A única amostra que apresentou diferença nos halos dos antibióticos com e sem cloxacilina foi a amostra 54 que apresentou uma inibição no disco de cefoxitina – Presença de AmpC.

3.9.3. Pesquisa de ESBL e KPC - Teste de inibição com o ácido borónico

Nas amostras 14, 52 e 54 efectuou-se o teste de inibição com o ácido borónico em conjunto com o teste de sinergia com o ácido clavulânico. Os resultados estão apresentados na tabela 31 e figura 31.

TABELA 31 – TESTE DE INIBIÇÃO COM ÁCIDO BORÓNICO						
Antibiótico	Amostra 14 (<i>P.aeruginosa</i>) Halo (mm)		Amostra 52 (<i>E.coli</i>) Halo (mm)		Amostra 54 (<i>K.pneumoniae</i>) Halo (mm)	
	Sem ácido borónico	Com ácido borónico	Sem ácido borónico	Com ácido borónico	Sem ácido borónico	Com ácido borónico
Imipenem	0	18	31	31	26	29
Cefotaxima	0	0	0	12	23	24
Ceftazidima	22	24	13	18	20	24
AMC	0		>18		10	

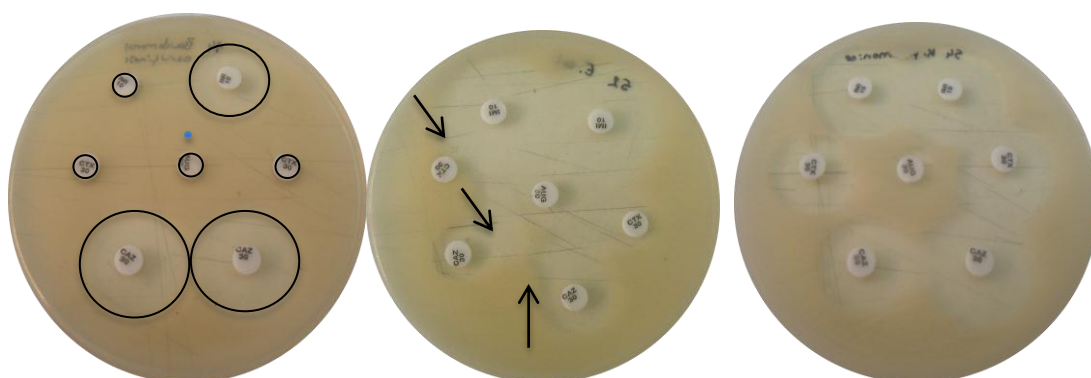


Figura 31 – Teste de inibição com o ácido borónico. Amostra 14 (esquerda), Amostra 52 (centro) e amostra 54 (direita). Halos de inibição, com as zonas de sinergia entre o ácido clavulânico e as cefalosporinas (indicadas pelas setas pretas) evidenciando a presença de uma ESBL na amostra 52.

Na amostra 14 verificou-se a inibição com ácido borónico para o disco de imipenem – provável OXA. As OXA conferem um fenótipo com resistência às aminopenicilinas, carboxipenicilinas e ureidopenicilinas sendo insensíveis à acção dos inibidores das β -lactamases. Uma das características das OXA é uma sensibilidade reduzida à cefepima. No grupo das OXA também se encontram variantes que hidrolisam os carbapenemos. A amostra 14 apresenta todas estas características fenotípicas.

Na amostra 52 verificou-se inibição com o disco de cefotaxima e sinergia com o disco de AMC – Presença de ESBL

Na amostra 54 não se verificou inibição com o ácido borónico nem sinergia com o disco de AMC.

3.9.4. Pesquisa de ESBL e AmpC utilizando kits comerciais

TABELA 32 – TESTE COM MASTDICS			
Discos	Amostra 58 (<i>K.pneumoniae</i>) Halo (mm)	Amostra 59 (<i>K.pneumoniae</i>) Halo (mm)	Amostra 68 (<i>P.aeruginosa</i>) Halo (mm)
A	0 (6)	21	0
B	13	21	0
C	0	21	0
D	14,5	21	0
B-A	7	0	0
D-C	7,5	0	0
D-B	1,5	0	0
C-A	0	0	0
Resultado	Actividade ESBL (B-A e D-C \geq 5 mm e D-B e C-A $<$ 5 mm)	Ausência de actividade ESBL ou AmpC	Ausência de actividade ESBL ou AmpC (porinas)

3.10. Caracterização molecular dos determinantes de resistência

Para a caracterização molecular dos determinantes genéticos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos foram seleccionadas estirpes com resistência a antibióticos β -lactâmicos – AMC e cefalosporinas de 3ª geração e foram pesquisados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV}.

Nos isolados com resistência a quinolonas foram pesquisados os genes *qnrS*, *qnrB* e *aac(6')-Ib-cr*, este último nos isolados que apresentavam simultaneamente resistência ou susceptibilidade reduzida a aminoglicosídeos.

Nos isolados com resistência à fosfomicina foram pesquisados os genes *fosA* em *K.pneumoniae* e *fosA₃* em *E.coli*

Na tabela 33 e 34 apresentam-se os resultados das reacções de PCR efectuadas e das sequenciações dos genes.

Resultados

TABELA 33 – RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS ESTIRPES DE *E. COLI*

Isolado (Nº)	Sexo/ Idade	Obs	Antibióticos Resistentes	Genes de Resistência a antibióticos/Genes sequenciados								Factores de virulência		
				CTX	TEM	SHV	Integração	qnrB	qnr S	aac	Fos A3	ecpA	PAP	fimH
1	F86	Inf. anteriores	AMX, NOR, CIP, SXT				300 pb	-	-				+	+
3	F90	Lar Inf. anteriores	AMX, CF, G, NOR, CIP(I), SXT, FN (I)				750 pb <i>dfrA₇</i>	-		-			+	-
4	F32	Inf. anteriores	AMX, CF, CXM, CTX, G, T(I), CIP,	+	-		1750 pb	-		+			+	-
6	F79	Lar Inf. anteriores	AMX, AMC, CF, CXM, CTX, T, NOR, CIP, SXT	-	+ <i>bla_{TEM-1}</i>		700 pb	-		-			-	+
7	F48		AMX, CF, CXM (I), FOX (I), G / T(I), NOR, CIP, SXT		+		1700 pb <i>dfrA₁₇</i> <i>aadA₅</i>	-		-			+	-
8	F56		AMX, AMC(I), CF (I), SXT		+		1000 pb <i>aadA₁</i>						-	-
9	F30		AMX, SXT				1700 pb						+	+
10	F44		AMX, SXT				1750 pb <i>dfrA₁₇</i> <i>aadA₅</i>						+	+
11	F42	Grávida	AMX, AMC(I), CF, CXM (I), SXT		+		750 pb						-	-
12	F37	Inf. anteriores	AMX, SXT		+		1750 pb						+	+
13	F11		AMX, NOR, SXT				1750 pb						+	+
15	F23	Grávida	AMX, CF (I), SXT, FN (I)				300 pb						+	-
16	F48	Inf. anteriores	AMX, CF										+	+
17	F24		AMX, CF, NOR, SXT				-						+	-
18	F23		AMX, SXT, FN (I)	-			750 pb						+	+
19	F56		AMX, CF (I), NOR, CIP, SXT, FN (I)				1750 pb	-	-				-	-
21	F43	Inf. anteriores	AMX, AMC (I), CF (I), CXM, FOX (I), NOR, CIP, SXT				1750 pb	-	+				-	-
23	F61	Diabética Inf. anteriores	AMX, AMC, G,T		+		500 pb						-	+

Resultados

TABELA 33– RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS ESTIRPES DE *E. COLI* (CONT.)

Isolado (Nº)	Sexo/Idade	Obs	Antibióticos Resistentes	Genes de Resistência a antibióticos/Genes sequenciados							Factores de virulência			
				CTX	TEM	SHV	Integração	qnrB	qnr S	aac	Fos A3	ecpA	papC	fimH
26	F26	Inf. anteriores	AMX, AMC, CF, CXM, CTX, CAZ, T, NOR, CIP, SXT	-	+		-	-	-	+	-	-	-	
27	F43		AMX, AMC (I), CF, CXM (I), FN (I)		+							+	+	
28	F61	Inf. anteriores	AMX, NOR, CIP(I),SXT				-	-	-			+		
29	F24		AMX, SXT				1750 pb					+	+	+
30	F40		AMX, CF, NOR									+		
31	F31		AMX, CF (I), NOR, CIP(I), SXT				-	-	-			+	+	+
32	F30	Inf. anteriores	AMX, CF (I), NOR, CIP, SXT				1750 pb	-	-			+	-	+
33	F38	Inf. anteriores	AMX, CF, G, T(I), NOR, SXT				1750 pb					+	-	+
35	F34		AMX, CF, NOR, CIP, SXT				-	-	-			+	-	+
36	M79	Lar	AMX, AMC (I), CF, CXM, CTX, T, NOR, CIP	+	+		1750 pb	-	-	+		+	-	+
37	F23	Grávida Inf. anteriores	AMX, CF (I), SXT, FN (I))	bla _{CTX-M}			300 pb					+	-	+
38	F81	Inf. anteriores	AMX, AMC(I), CF, CXM, FOX, G, T(I), NOR, CIP, SXT, FN(I)		+		250 pb	-	-	-		-	-	+
39	F49	Inf. anteriores	CF (I), NOR, CIP					-	-			+	-	+
41	M75		AMX, CF, CXM, CTX, NOR, CIP,SXT, FN (I)	-	+		1750 pb	-	-			-	-	-
42	M57	Diabético	AMX, CF (I), G, T(I), NOR, CIP, SXT				1750 pb	-	-	-		-	-	-
44	F62	Inf. anteriores	AMX, AMC (I), CF, CXM (I), SXT		+		1700 pb					-	-	+
45	F31	Grávida	AMX, SXT				-					+	-	+
46	F101	Lar Inf. anteriores	AMX, CF, CXM, CTX, CAZ, NOR, CIP, FN (I)	-	+	+		-	-			-	-	+

TABELA 33 – RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS ESTIRPES DE *E. COLI* (CONT.)

Isolado (Nº)	Sexo/Idade	Obs	Antibióticos Resistentes	Genes de Resistência a antibióticos/Genes sequenciados							Factores de virulência				
				CTX	TEM	SHV	Integração	qnrB	qnr S	aac	Fos A3	ecpA	papC	fimH	
47	F74	Diabético Inf. anteriores	AMX, CF (I), CXM (I), NOR, CIP					-	-			-			
49	F38		F (I)									+	-	-	+
50	M64		AMX, NOR, CIP, SXT				-	-	-				-		-
51	F60		AMX, AMC (I), CF (I), T, NOR, CIP		-		-	-	-	+			-		-
52	F83	Inf. anteriores	AMX, AMC (I), CF, CXM, FOX(I), CTX, CAZ, CEF (I), T(≥16), NOR, CIP, F (I)	+	+		700 pb	-	-	+		+	-		+
53	F83	Inf. Anteriores Algaliada	AMX, CF, CXM, CTX, NOR, CIP	+	+			-	-				-		+

Resultados

TABELA 34– RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS ESTIRPES DE *K.PNEUMONIAE*

Isolado (Nº)	Sexo/ Idade	Obs	Antibióticos Resistentes	Genes de Resistência a antibióticos/Genes sequenciados								Factores de virulência			
				CTX	TEM	SHV	Integração	qnrB	qnr S	aac	Fos A	mrkD	khe	fimH	
24	M85	Lar Diabético	CF, CXM (I), CTX, CAZ, NOR, CIP, SXT, FN	-	-	+ <i>bla_{SH}</i> V-2	1500 pb <i>dfrA₁+orf C</i>	-	+ <i>qnrS</i>				+	+	+
34	M66	Diabético Inf. Anteriores	CF, CXM,CTX, CAZ, CEF, NOR, CIP, FN	+ <i>bla_{CTX-M-82}</i>	+	+		+ <i>qnrB</i>	-				+	+	+
40	M66	Inf.anteriores	CF, CXM, CTX, CAZ, NOR, CIP, SXT, FN	+ <i>bla_{CTX-M}</i>	+	+	700+200 0 pb	+ <i>qnrB</i>	-		+ <i>fosA</i>		+	+	+
43	F26		AMC, FN	-	+	+		+					+	+	+
54	M36	Inf. anteriores	AMC, CF, CXM (I), FOX, T, NOR, CIP, SXT, FN	-	-	+	100 pb	+ <i>qnrB₄</i>	-	+ <i>aac(6')-Ib-cr</i>			+	+	+
55	F70		AMC, CF, CXM, CTX, CAZ, CEF, G, T, NOR, CIP, F, SXT, FN	+ <i>bla_{CTX-M-15}</i>	+	+	700 pb	-	-	+ <i>aac(6')-Ib-cr</i>		+	+	+	+
56	F71	Diabético	NOR, SXT, FN (I)				750 pb						+	+	+
57	F82	Inf.anteriores Lar	AMC (I), CF (I), CXM (I), NOR, CIP, SXT, FN		+	+	700 pb <i>dfrA25</i>	+ <i>qnrB₂</i>	-				+	+	+
58	F31	Inf.anteriores	AMC, CF, CXM, FOX, CTX, CAZ, CEF, T, NOR, CIP (I), SXT, FN	+ <i>bla_{CTX-M}</i>	+	+	-	+	-				+	+	+
59	M37	Inf. anteriores	AMC (I), CF, CXM, FOX, T, NOR, CIP, SXT, FN		-	+	200 pb	-	-	+ <i>aac(6')-Ib-cr</i>			+	+	+
60	F48		NA (I), FN										+	+	+
61	M82	Lar Inf. anteriores	F								+ <i>fosA</i>		+	+	+
62	F56		FN, SXT				750 pb						+	+	+
63	F27	Grávida	FN										+	+	+
65	F94	Diabética Inf.anteriores	F, FN (I)								+		+	+	+
67	M48	Inf.anteriores	SXT, FN (I)				-						+	+	+

A figura 32 exemplifica uma fotografia de um gel obtido após electroforese dos produtos amplificados por reacção de PCR.

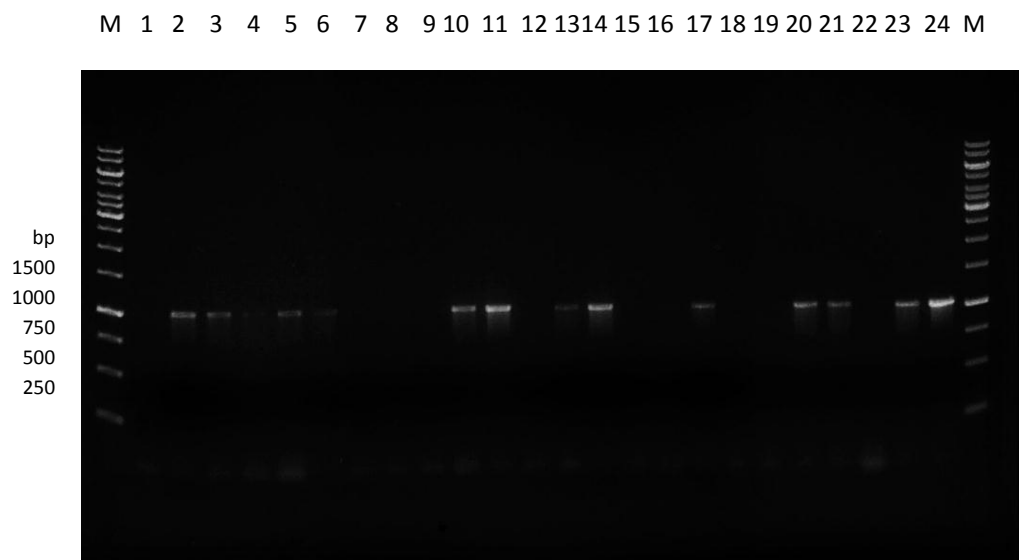


Figura 32 – Amplificação por PCR dos genes de resistência *bla*_{TEM}. Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1x, a 190V durante 55 minutos. M – marcador de pesos moleculares, 1 a 24 – Produtos de amplificação em isolados de *E.coli* e *K.pneumoniae* testados. Isolados nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 20, 21, 23 e 24 positivos para *bla*_{TEM} (1058 bp). Isolados nas posições 1, 7, 8, 12, 15, 16, 18, 19 e 22 negativos para *bla*_{TEM}

Em todos os isolados em que se verificou resistência ao SXT e/ou a aminoglicosídeos efectuou-se a pesquisa de Integrões de classe 1 utilizando *primers* específicos.

O resultado das amplificações para os integrões de classe 1 foram positivos para 72,3 % dos isolados analisados.

Dos 39 isolados com resistência ao SXT houve amplificação em 30 isolados (76,9%). Foram amplificados fragmentos de diversos tamanhos desde 100 pb até 1750 pb.

Foram seleccionados alguns isolados para confirmação por sequenciação. Após análise das sequências identificou-se a presença dos seguintes genes: *dfrA*₇ (num integrão de 750 pb), *dfrA*₁₇ e *aadA*₅ (num integrão de 1700 pb), *aadA*₁ (num integrão de 1000 pb), *dfrA*₁₇ e *aadA*₅ (num integrão de 1750 pb), *dfrA*₁ e *orfC* (num integrão de 1500 pb), *dfrA*₂₅ (num integrão de 700 pb). Na figura 33 encontra-se o alinhamento das sequências obtidas com a sequência do gene *dfrA*₇ contido na base de dados do NCBI.

Os genes *dfr* codificam uma dihidrofolato redutase tipo 1 que confere resistência ao trimetoprim.

```

3          GGCTTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCC 60
-----

3          CTAAAACAAAGTTAGCCATTACGGGGGTTGAA*TTGAAAATTTTCATTGATTTCTGCAACGT 120
dfrA7     -----*TTGAAAATTTTCATTGATTTCTGCAACGT 28
          *****

3          CAGAAAATGGCGTAATCGGTAATGGCCCTGATATCCCATGGTCAGCAAAAGGTGAGCAGT 180
dfrA7     CAGAAAATGGCGTAATCGGTAATGGCCCTGATATCCCATGGTCAGCAAAAGGTGAGCAGT 88
          *****

3          TACTCTTTAAAGCGCTCACATATAATCAGTGGCTCCTTGTGGAAGGAAAACATTTGACT 240
dfrA7     TACTCTTTAAAGCGCTCACATATAATCAGTGGCTCCTTGTGGAAGGAAAACATTTGACT 148
          *****

3          CTATGGGTGTTCTTCCAAATCGAAAATATGCAGTAGTGTGAGGAAAGGAATTTCAAGCT 300
dfrA7     CTATGGGTGTTCTTCCAAATCGAAAATATGCAGTAGTGTGAGGAAAGGAATTTCAAGCT 208
          *****

3          CAAATGAAAATGTATTAGTCTTTCCTTCAATAGAAATCGCTTTGCAAGAACTATCGAAA 360
dfrA7     CAAATGAAAATGTATTAGTCTTTCCTTCAATAGAAATCGCTTTGCAAGAACTATCGAAA 268
          *****

3          TTACAGATCATTTATATGTCTCTGGTGGCGGTCAAATCTACAATAGTCTTATTGAAAAAG 420
dfrA7     TTACAGATCATTTATATGTCTCTGGTGGCGGTCAAATCTACAATAGTCTTATTGAAAAAG 328
          *****

3          CAGATATAATTCATTTGTCTACTGTTTACAGTTGAGGTTGAAGGTGATATCAATTTTCCTA 480
dfrA7     CAGATATAATTCATTTGTCTACTGTTTACAGTTGAGGTTGAAGGTGATATCAATTTTCCTA 388
          *****

3          AAATCCAGAGAATTTCAATTTGGTTTTTTGAGCAGTTTTTTTTGTCTAATATAAATTACA 540
dfrA7     AAATCCAGAGAATTTCAATTTGGTTTTTTGAGCAGTTTTTTTTGTCTAATATAAATTACA 448
          *****

3          CATATCAGATTTGGAAAAAAGGCTAA*CAAGTCGTTCCAGCACCAGTCGCTGCGCTCCTTG 600
dfrA7     CATATCAGATTTGGAAAAAAGGCTAA-----*CAAGTCGTTCCAGCACCAGTCGCTGCGCTCCTTG 474
          *****

3          GACAGTTTTTAAGTCGCGGTTTTATGGTTTTTGTGCGCAAAAGTATCCATAAAACCACA 660
-----

3          ACTTAAAAACTGCCGCTGAACCTCGCGTTAGATGCACTAAGCACATAATTGCTCACAGCC 720
-----

3          AACTATCAGGCAAGTTTCTGCTTAAAAAATG 753
-----

```

Figura 33 - Alinhamentos das sequências nucleotídicas de do gene *dfrA7* e do produto de PCR sequenciado da amostra 3. A estrela (*) indica quando as bases são as mesmas. A sequência do gene encontra-se a amarelo. A ladear a sequência do gene encontram-se as sequências 3' conservadas (em azul) e 5' conservadas (a vermelho) do integrão de classe 1. (Alinhamento gerado pelo software ClustalW2).

Pesquisou-se o gene *bla*_{TEM} em 27 isolados. Em 21 o resultado foi positivo. Foi enviada para sequenciação apenas uma amostra. Confirmou-se a presença do gene *bla*_{TEM-1}.

Pesquisou-se o gene *bla*_{SHV} em 10 isolados, em 7 o resultado foi positivo, 6 desses resultados pertenciam a estirpes de *K.pneumoniae*. Na amostra 24 foi identificado o gene *bla*_{SHV-2}, correspondendo a um fenótipo ESBL.

Nas amostras com resistência ao CTX pesquisou-se o gene *bla*_{CTX}. Em 15 isolados, 8 foram positivos para *bla*_{CTX-M}. Houve homologia com *bla*_{CTX-M-15} mas também possibilidade de *bla*_{CTX-M-11} ou *bla*_{CTX-M-55}. Para a identificação completa teria que ser realizado novo PCR com primers dirigidos para a *bla*_{CTX-M}.

Nos isolados com resistência às quinolonas detectaram-se amplificações para o gene *qnrB* em 6 dos 15 isolados testados e para o gene *qnrS* em 2 dos 27 isolados testados. Foram confirmados por sequenciação os genes *qnrB2*, *qnrB4* e *qnrS*.

Nos isolados com resistência simultânea a quinolonas e a aminoglicosídeos pesquisou-se a presença do gene *aac(6')-Ib-cr*. Houve amplificação em 8 dos 13 isolados testados. Nos três isolados enviados para sequenciação confirmou-se a presença do gene *aac(6')-Ib-cr*.

Nos isolados de *K.pneumoniae* com resistência à fosfomicina pesquisou-se o gene *fosA* que foi positivo em todas as amostras testadas. Foi confirmada a sequência em 3 das amostras.

Nos isolados de *E.coli* com resistência à fosfomicina pesquisou-se o gene *fosA₃* que foi positivo nas duas amostras testadas. Foi enviada para sequenciação uma das amostras e foi confirmada a sequência.

3.11. Factores de virulência de *Klebsiella pneumoniae*

Foram pesquisados os seguintes genes que codificam determinantes de virulências nas estirpes de *K.pneumoniae*:

- Gene *khe*: codifica uma hemolisina
- Gene *mrkD* variantes 2 e 3: codifica fímbrias do tipo 3 (manose resistentes)
- Gene *fimH*: codifica a adesina FimH das fímbrias tipo 1 (manose sensíveis)

Foram analisadas 16 estirpes de *K. pneumoniae* que apresentavam resistência *in vitro* a um ou mais antibióticos e 5 estirpes de *K.pneumoniae* sem resistência a qualquer um dos antibióticos testados. Na tabela 35 encontra-se o resumo dos resultados obtidos nas estirpes sensíveis de *K.pneumoniae*. Os resultados das amostras resistentes encontram-se na tabela anterior (34)

TABELA 35 – RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS AMOSTRAS DE <i>K.PNEUMONIAE</i> SENSÍVEIS					
Isolado (Nº)	Sexo/Idade	Obs	Factores de virulência		
			<i>mrkD</i>	<i>khe</i>	<i>fimH</i>
CK1	F76	Diabética	+	+	+
CK2	F17	Inf.anteriores	-	+	+
CK3	M76		-	+	-
CK4	F75		+	+	+
CK5	F52		+	+	+

Na tabela 36 encontra-se o resumo dos resultados obtidos para os factores de virulência de *K.pneumoniae*.

TABELA 36 – RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PARA OS FACTORES DE VIRULÊNCIA DE *K.PNEUMONIAE*

Tipagem da virulência, isolados de <i>K.pneumoniae</i>	Estirpes sensíveis	Estirpes resistentes	Valores p^*
Genótipo <i>FimH</i> Positivo (Nº positivos/Nº total)	4/5 (80%)	16/16 (100%)	0,24
Genótipo <i>mrkD</i> Positivo (Nº positivos/Nº total)	3/5 (60%)	16/16 (100%)	0,05
Genótipo <i>khe</i> positivo (Nº positivos/Nº total)	5/5 (100%)	16/16 (100%)	-

* teste exacto de Fisher

Todas as 16 estirpes resistentes estudadas eram positivas para *fimH*, *khe* e *mrkD*.

Das 5 amostras sensíveis estudadas, as 5 eram positivas para *khe*, 4 eram positivas para *fimH*, e 3 para *mrkD*.

Verifica-se que a percentagem dos factores de virulência testados é maior nos isolados resistentes do que nos isolados sensíveis. No entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para os factores de virulência entre os grupos de bactérias sensíveis e resistentes.

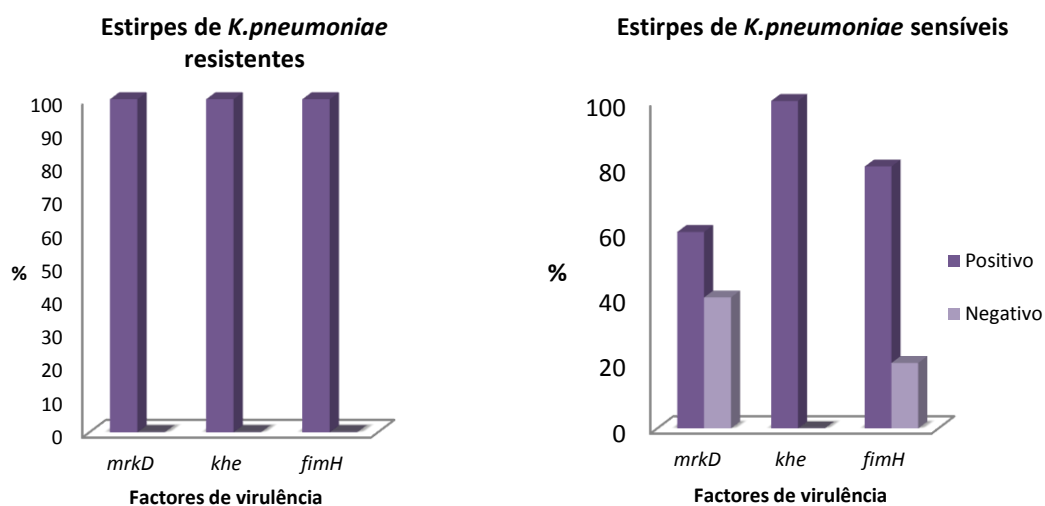


Figura 34 – Factores de virulência de *K.pneumoniae* testados nas estirpes resistentes e sensíveis

3.12. Factores de virulência de *E.coli*

Foram pesquisados os seguintes genes que codificam determinantes de virulências nas estirpes de *E.coli*:

- Gene *fimH*: codifica a adesina FimH das fímbrias tipo 1 (manose sensíveis)
- Gene *ecpA*: codifica o ECP (*E.coli common pilus*)

- Gene *papC*: constituinte das fímbrias do tipo P

Foram analisadas 42 estirpes de *E.coli* que apresentavam resistência *in vitro* a um ou mais antibióticos e 43 estirpes de *E.coli* sem resistência a qualquer um dos antibióticos testados. Na tabela 37 encontra-se o resumo dos resultados obtidos nas estirpes sensíveis de *E.coli*. Os resultados das amostras resistentes encontram-se na tabela anterior (33)

TABELA 37– RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS AMOSTRAS DE <i>E.COLI</i> SENSÍVEIS					
Isolado (Nº)	Sexo/Idade	Obs	Factores de virulência		
			<i>ecpA</i>	<i>papC</i>	<i>fimH</i>
C2	F75	Inf. anteriores	+		
C3	F50	Inf. anteriores	+	-	+
C4	F80	Inf. anteriores	-		
C5	M77		-		
C6	F31	Grávida	+	-	-
C7	F80	Inf. anteriores	-		
C8	F79	Lar	+		
C9	F59		+	+	+
C10	F60	Diabética	+	-	+
C11	F43		+	-	-
C12	F43		+	+	+
C13	F36		+	-	+
C14	F80		+		
C15	F61		+	+	+
C17	F25		+	+	-
C18	F43	Inf. anteriores	-	-	-
C19	F25	Inf. anteriores	+	-	+
C21	M67		+		
C22	F23	Grávida	+	+	-
C23	M86	Diabético	-		
C24	F42		+	-	+
C25	F84		-		
C26	F74	Inf. anteriores	-		
C27			-		
C28	F12	Inf. anteriores	-	+	-

TABELA 37 – RESUMO DAS REACÇÕES DE PCR EFECTUADAS NAS AMOSTRAS DE *E. COLI* SENSÍVEIS (CONT.)

Isolado (Nº)	Sexo/Idade	Obs	Factores de virulência		
			<i>ecpA</i>	<i>papC</i>	<i>fimH</i>
C30	F79	Inf.anteriores	+		
C31	F31	Diabética	+	-	+
C32	F81		-		
C33	F42		+	+	-
C34	F65		-		
C35	F60	Inf.anteriores	+	-	-
C37	F40		+	+	+
C38	F75	Inf.anteriores	-		
C39	F61		+	-	+
C40	F34	Inf.anteriores	+	-	+
C41	F84		+		
C42	M41		-		
C43	F40		+	+	+
C44	F41		+	+	+
C45	F22		+	-	+
C46	F51		+	-	+
C47	F7	Inf.anteriores	-	+	-
C49	F42		+	+	+

3.12.1. Gene *ecpA*

Das amostras seleccionadas para amplificação de *ecpA* 53 das 85 (62,4%) estirpes analisadas eram positivas para *ecpA*. 24 das 42 (57,1%) estirpes com resistência a antibióticos eram positivas para *ecpA*. 29 das 43 (67,4%) estirpes de *E.coli* analisadas sensíveis aos antibióticos eram positivas para *ecpA*.

Verificou-se que a percentagem de positividade para o gene *ecpA* que codifica o *E.coli common pilus* (EcpA) era superior nas estirpes sensíveis aos antibióticos comparativamente com as estirpes resistentes aos antibióticos.

Na figura 35 encontram-se os resultados da pesquisa do gene *ecpA* efectuado nas estirpes de *E.coli*.

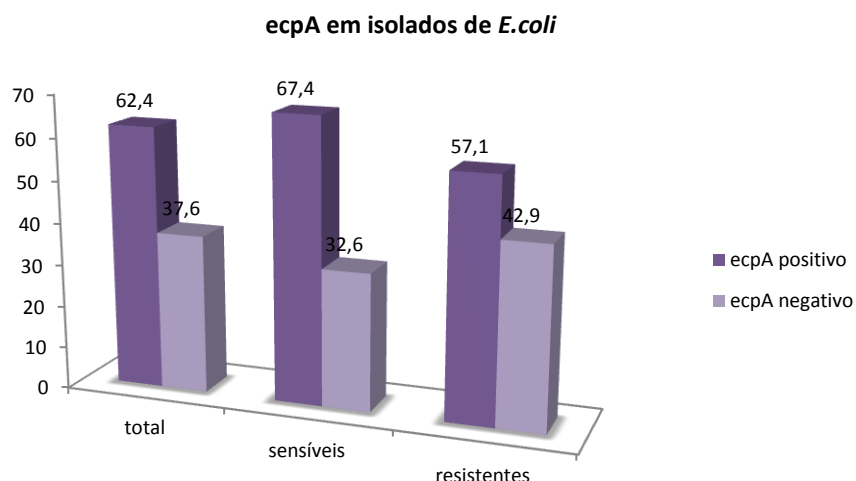


Figura 35 – *ecpA* nas estirpes de *E.coli* analisadas

3.12.2. Gene *fimH*

No total de 65 isolados de *E. coli* analisados para o gene *fimH*, 48 eram positivos para *fimH* (73,8%). Dos 39 isolados de *E. coli* resistentes estudados, 31 eram positivos para *fimH* (79,5%). Das 26 estirpes sensíveis estudadas 17 eram positivas para *FimH* (65,4%). Na figura 36 encontram-se os resultados da pesquisa do gene *fimH* efectuado nas estirpes de *E. coli*.

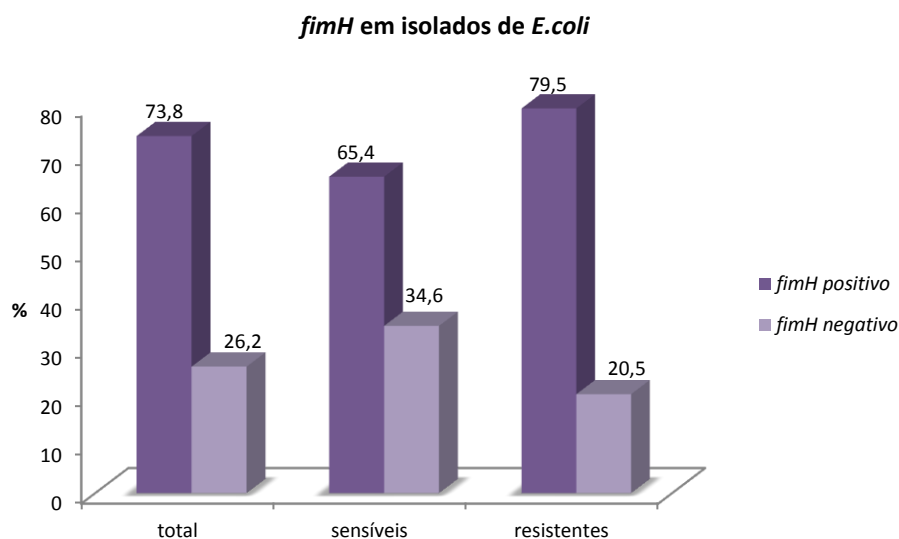


Figura 36 – *fimH* nas estirpes de *E.coli* analisadas

3.12.3. Gene *papC*

Das 49 amostras estudadas, 19 eram positivas para *papC* (38,8%). Das 26 amostras sensíveis estudadas, 12 eram positivas para *papC* (46,2%). Das 23 amostras resistentes estudadas, 7 eram positivas para *papC* (30,4%). Na figura 37 encontram-se os resultados da pesquisa do gene *papC* efectuado nas estirpes de *E. coli*.

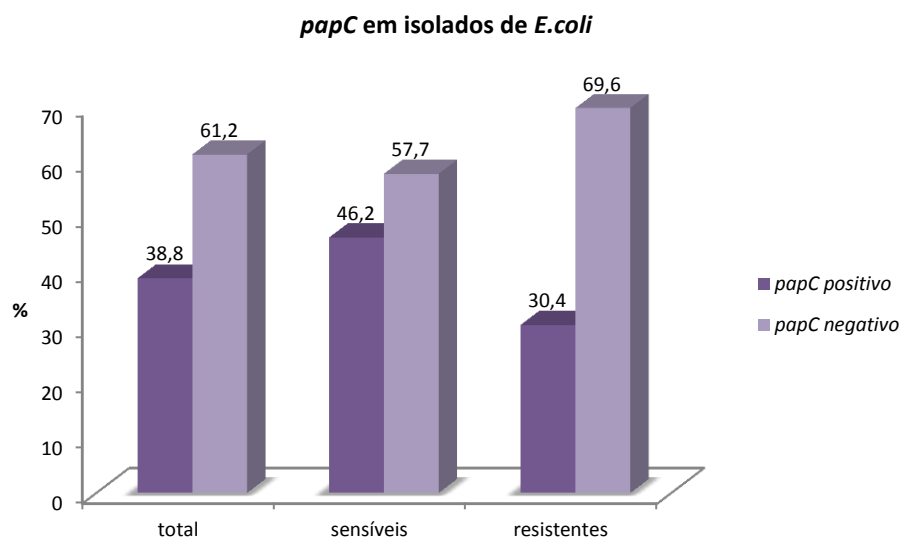


Figura 37 – *papC* nas estirpes de *E. coli* analisadas

Na tabela 38 encontra-se o resumo dos resultados obtidos para a pesquisa de factores de virulência em estirpes de *E. coli* sensíveis e resistentes aos antibióticos.

TABELA 38 – RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PARA OS FACTORES DE VIRULÊNCIA DE <i>E. COLI</i>			
Tipagem da virulência, isolados de <i>E. coli</i>	Estirpes sensíveis	Estirpes resistentes	Valores p^*
Genótipo <i>Fim</i> Positivo (Nºpositivos/Nºtotal)	17/26 (65,4%)	31/39 (79,5%)	0,205
Genótipo <i>ecpA</i> Positivo (Nºpositivos/Nºtotal)	29/43 (67,4%)	24/42 (57,1%)	0,327
Genótipo <i>pap</i> Positivo (Nºpositivos/Nºtotal)	12/26 (46,2%)	7/23 (30,4%)	0,260

* Teste χ quadrado de Pearson

7 isolados sensíveis e 7 isolados resistentes foram positivos para os três factores de virulência em simultâneo.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na frequência dos factores de virulência estudados para *E. coli* entre o grupo das estirpes sensíveis e o das estirpes resistentes.

3.13. Análise da relação clonal

BOX-PCR *fingerprinting*

A caracterização genotípica de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* foi efectuada de modo a verificar se existia alguma relação clonal entre as estirpes provenientes do mesmo doente e entre estirpes provenientes de doentes do mesmo lar. Nas estirpes

isoladas verificou-se que existiam duas estirpes de *E.coli* provenientes do mesmo doente isoladas em alturas diferentes, quatro estirpes de *K.pneumoniae* provenientes do mesmo doente isoladas em alturas diferentes e duas estirpes de *E.coli* provenientes de dois doentes oriundos do mesmo lar.

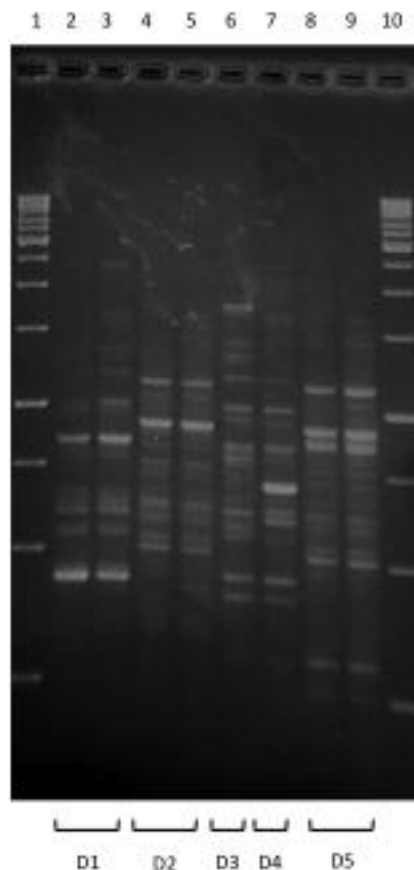


Figura 38 – resultado do BOX PCR – *fingerprinting*: 1 e 10 – Marcadores de peso molecular; 2 e 3 – *E.coli* amostras 15 e 37 isoladas do mesmo doente (D1) em alturas diferentes; 4 e 5 – *K.pneumoniae* amostras 54 e 59 provenientes do mesmo doente (D2) isoladas em duas alturas diferentes; 6 e 7 – *E.coli* amostras 3 e 46 isoladas de dois doentes (D3 e D4) provenientes do mesmo lar; 8 e 9 – *K.pneumoniae*, amostras 34 e 40 provenientes do mesmo doente (D5) isoladas em alturas diferentes.

Pela análise do perfil electroforético representado na figura 38 visualizam-se 5 perfis electroforéticos diferentes. Verifica-se que o perfil das amostras 15 e 37 isoladas do mesmo doente (D1) são iguais, o que revela que a infecção foi provocada pelo mesmo clone de *E.coli* em alturas distintas. O mesmo se verifica para os isolados de *K.pneumoniae* amostras 54 e 59 (D2) e para as amostras 34 e 40 (D5). A infecção destes dois doentes foi provocada em cada uma das vezes pelo mesmo clone de *K.pneumoniae*. Nas amostras 3 e 46 não se verifica homologia portanto as infecções foram provocadas por dois clones não relacionados geneticamente.

As amostras 15 e 37 apresentavam o mesmo perfil no antibiograma. As amostras 54 e 59 apresentavam o mesmo perfil com apenas ligeiras alterações entre susceptibilidade diminuída e resistência em dois antibióticos – AMC e CXM – diferenças na CMI de uma diluição.

4. Discussão e Conclusões

Durante o ano de 2010 foi detectada ITU, com o isolamento de agentes etiológicos, em 18% das urinas analisadas. A taxa de infecção foi superior nas mulheres relativamente aos homens. Isto é explicado tendo em conta as diferenças anatómicas entre os dois sexos que facilitam a ITU nas mulheres, tais como o facto destas possuírem uma uretra mais curta que facilita a contaminação fecal mais facilmente. Nos homens a taxa de ITU é superior em idades mais avançadas devido provavelmente à existência de doenças prostáticas comuns nestas idades.

Escherichia coli foi o principal agente uropatogénico isolado em todos os grupos etários. Isto pode ser justificado pelo facto deste microrganismo, além de colonizar o tracto gastrointestinal, possuir características estruturais e capacidade de invasão do uroepitélio que lhe permitem ascender e permanecer no trato urinário, diferenciando-se de outras enterobactérias que são encontradas em número muito inferior.

Outras enterobactérias como *K.pneumoniae* e *P.mirabilis* foram os microorganismos isolados em maior percentagem a seguir à *E.coli*, em todos os grupos analisados com excepção da mulher grávida, em que *E.faecalis* foi o segundo principal agente etiológico isolado, e nos diabéticos em que foi o terceiro agente etiológico mais isolado a seguir à *K.pneumoniae*.

A tendência mundial aponta como segundo agente mais frequente de infecção urinária o *S.saprophyticus*^[1]. Este facto não se verificou neste estudo. Tal pode ser explicado pelo facto do *S.saprophyticus* provocar infecção principalmente nas mulheres mais jovens e estas poderem não recorrer aos laboratórios de prestação de serviços à comunidade, tendo como primeira opção o serviço hospitalar ou serem tratadas empiricamente sem necessidade de efectuarem uma urocultura.

Na mulher jovem sexualmente activa e sem factores de risco, as cistites agudas são causadas quase exclusivamente por *E.coli*. a incidência de ITU é maior no sexo feminino e no grupo etário com mais de 60 anos. O aumento da incidência da infecção urinária nesta faixa deve-se principalmente a situações associadas com a idade, como alterações funcionais do trato genito-urinário, incontinência e aumento da instrumentação urológica^[39].

Nos homens a incidência da ITU aumenta a partir da idade do início das relações sexuais, sendo máxima entre os 60 e 90 anos devido a patologia obstrutiva do tracto urinário inferior. Por outro lado, as mulheres apresentam uma distribuição bimodal com um primeiro pico de incidência que afecta as mulheres jovens entre 20 e 35 anos, saudáveis e em relação com o início da vida sexual activa, e um segundo pico entre os 65 e os 85 anos relacionado com as alterações anatómicas e hormonais da menopausa^[30]. O pico das infecções urinárias ocorreu numa idade avançada, o que

pode ser explicado pelo facto da população portuguesa estar a envelhecer e haver um aumento de instituições de cuidados terciários e do facto da população idosa ser mais susceptível a este tipo de infecções, devido a alterações associadas à idade como a menopausa, mas também modificações funcionais do aparelho genito-urinário e do sistema imunitário. Também o facto já descrito acima da população mais jovem recorrer a cuidados primários pode explicar este pico em idade mais avançadas.

A ITU ocorre em mulheres com diabetes mellitus mais frequentemente do que em mulheres sem diabetes, são mais graves e geralmente têm complicações que de outro modo são raras. A bacteriúria assintomática ocorre 3 vezes mais em mulheres com diabetes do que em mulheres saudáveis. A bacteriúria assintomática está associada com o risco aumentado de infecção sintomática mas não é a causa. Os agentes mais comuns nas mulheres diabéticas são *E.coli*, *Klebsiella* sp. *Enterococcus* sp e *S.agalactiae*. Os factores de risco para a bacteriúria assintomática nas mulheres diabéticas incluem relações sexuais, grau de controlo metabólico, duração da diabetes, presença de complicações diabéticas e uso de insulina^[10].

Foi encontrada uma elevada taxa de resistência nos uropatógenos estudados. 53,9% das estirpes isoladas apresentava resistência pelo menos a um dos antibióticos testados.

A taxa de resistência encontrada em *E.coli* foi elevada para alguns dos fármacos mais utilizados no tratamento da infecção urinária, tais como aminopenicilinas, cotrimoxazol e fluoroquinolonas.

De acordo com o relatório anual do *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-net)^[69], Portugal apresenta uma das taxas mais elevadas de resistência à quinolonas da Europa, sendo em 2010 a taxa de 23,8%. Segundo este relatório Portugal tem para isolados invasivos de *E.coli* uma taxa de resistência de 54,3% às aminopenicilinas, 23,8% às fluoroquinolonas, 6,6% às cefalosporinas de 3ª geração e 9,5% aos aminoglicosídeos. 3,9% das estirpes são multirresistentes. Os valores encontrados para as estirpes isoladas de ITU foi um pouco mais baixo, 41,2% para as aminopenicilinas, 19,9% para as quinolonas (norfloxacin), 3% para as cefalosporinas de 3ª geração e 5,5% para os aminoglicosídeos. Esta diferença pode ser explicada pelo facto do relatório da EARS só analisar resultados de estirpes invasivas e não de isolados urinários e aquelas terem origem principalmente em hospitais onde a resistência antimicrobiana é superior à encontrada na comunidade.

De acordo com esse mesmo estudo, a taxa de resistência em *Klebsiella pneumoniae* invasivas às fluoroquinolonas foi de 23,7%, às cefalosporinas de terceira geração foi de 15,8%, e aos aminoglicosídeos foi de 19,5%. Os valores encontrados para as estirpes isoladas de ITU foram, tal como para *E.coli*, inferiores aos reportados para as estirpes

invasivas. 23,2% às fluoroquinolonas (norfloxacina), 5,4% para os aminoglicosídeos e 2,9% para cefalosporinas de 3ª geração.

A elevada susceptibilidade à fosfomicina e à nitrofurantoína (esta última apenas em isolados de *E.coli*), permite que estes antibióticos possam ser opções terapêuticas no tratamento empírico das cistites não complicadas, face às resistências detectadas em relação à associação trimetoprim/sulfametoxazol e quinolonas. Apesar de se ter verificado que 5-6% das estirpes eram resistentes aos antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina/ácido clavulânico e cefuroxima), estes antibióticos não devem ser utilizados no tratamento das cistites. A colonização do aparelho digestivo com estirpes produtoras de β -lactamases é cada vez maior, portanto a administração destes antibióticos pode contribuir para a selecção destas estirpes e permitir a sua disseminação^[39]

Nas estirpes isoladas foram detectados vários genes responsáveis pelos mecanismos de resistência das bactérias da comunidade. Foram detectados e sequenciados genes que codificam a resistência a antibióticos β -lactâmicos (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-2}, *bla*_{CTX-M-15}), resistência à fosfomicina (*fosA* e *fosA*₃), resistência a quinolonas (*qnrB*₂, *qnrB*₄ e *qnrS*₁), resistência a quinolonas e aminoglicosídeos (*aac(6')*-Ib-cr), resistência ao trimetoprim (*dfrA*₇, *dfrA*₁₇, *dfrA*₂₅) mostrando que os mecanismos de resistência estão disseminados na comunidade. Foram detectados integrões em muitas das amostras analisadas, integrões esses que podem ser o modo de transferência e aquisição de múltiplas resistências.

Além da crescente resistência, a *E.coli* possui também factores intrínsecos que contribuem para a complexa interacção entre o hospedeiro e o agente patogénico nas infecções urinárias. Os factores de virulência expressos pelo microrganismo estão associados a infecções severas invasivas, pois facilitam a colonização e proliferação no organismo humano. A adesão e invasão do epitélio da bexiga estão associadas, em *E.coli* uropatogénica, principalmente às adesinas fimbriais. Estas são essenciais para o estabelecimento inicial da infecção, permitindo a ascensão do microrganismo às vias urinárias superiores e levando à colonização do trato urinário^[16, 18, 23]. Entre elas estão as fímbrias do tipo 1 (operão *fim*), as do tipo P (operão *pap*) e o pílus ECP (*E.coli* Common Pilus, gene *ecpA*) analisadas neste estudo.

O estudo dos factores de virulência efectuado nas estirpes de *E.coli* isoladas em 2011 demonstrou um predomínio dos genes que codificam a adesina das fímbrias do tipo 1 (gene *fimH*), relativamente aos genes que codificam as fímbrias do tipo P (gene *papC*), estando ambas associadas à patogénese de *E.coli* nas infecções urinárias.

A adesina FimH adere aos receptores das unidades terminais manosiladas de uroplaquina altamente disseminadas pela superfície do tecido uroepitelial. Esta adesina intervém também no processo de invasão do epitélio vesical, permitindo

desencadear a resposta imunitária do hospedeiro e levar à internalização da *E.coli*. A sua elevada distribuição em isolados obtidos de infecções urinárias (presente em 73,8% dos isolados estudados) reforça a sua importância no estabelecimento destas infecções.

O gene que codifica a proteína PapC, constituinte das fímbrias tipo P, associadas principalmente às pielonefrites, foi detectado apenas em 38,8% dos isolados o que reflecte o facto da maior parte das ITU da comunidade serem cistites não complicadas.

O gene *ecpA*, responsável pela codificação do pílus ECP foi detectado em 62,4% dos isolados analisados. O ECP, em adição às fímbrias do tipo 1 e P pode contribuir para as propriedades de adesão de *E.coli*.

O gene *fimH* foi detectado num maior número de estirpes resistentes do que nas estirpes sensíveis (79,5% vs. 65,4%), no entanto a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa, enquanto os genes *papC* e *ecpA* foram encontrados em maior percentagem nas estirpes sensíveis relativamente às estirpes com resistência (46,2% vs. 30,4% e 67,4% vs. 57,1%), no entanto, a diferença encontrada também não foi estatisticamente significativa.

Nas estirpes de *K.pneumoniae* analisadas verificou-se uma elevada prevalência dos genes que codificam factores de virulência – *khe* que codifica uma hemolisina, *fimH* que codifica a adesina das fímbrias tipo 1 tal como em *E.coli* e *mrkD* que codificam as adesinas das fímbrias tipo 3. O gene *fimH* foi encontrado em 95,2% das amostras, o gene *khe* em 100% das amostras e o gene *mrkD* em 90,5% dos isolados.

Tal como para a *E.coli*, a capacidade da *K.pneumoniae* em aderir às superfícies tecidulares do hospedeiro, é um passo importante para o desenvolvimento da infecção. As fímbrias do tipo 1 medeiam a adesão a estruturas contendo manose. Tal como em *E.coli* são um factor de virulência importante para o estabelecimento de ITU^[25].

A adesina MrkD medeia a adesão da bactéria a estruturas com colagénio, tais como estruturas renais e células epiteliais do tracto urinário^[25]. Estudos efectuados em animais revelaram que as fímbrias tipo 3 não tem influência na patogenicidade na ITU, no entanto são importantes na formação de biofilmes^[70].

A elevada prevalência destes factores de virulência em estirpes de *K.pneumoniae* pode contribuir para o facto deste patógeno ser o segundo agente etiológico isolado em ITU neste estudo.

Com base nos dados obtidos não parece existir uma associação entre o fenótipo de resistência e o de virulência, no entanto são necessários mais estudos com maior número de amostras para se poder chegar a uma conclusão mais definitiva.

A diferenciação entre infecções recorrentes ou de repetição é baseada tendo em conta a diversidade bacteriana, ou seja, se for identificada a mesma estirpe bacteriana (genotipicamente caracterizada) poderá ser considerada uma infecção recorrente, enquanto nas infecções de repetição são isoladas estirpes genomicamente diferentes ou espécies bacterianas diferentes.

A análise por BOX PCR *fingerprinting* permite estabelecer uma relação clonal entre as estirpes estudadas. Estudaram-se 2 isolados de *E.coli* obtidos do mesmo doente em duas alturas diferentes, 2 isolados de *E.coli* pertencentes a duas pessoas da mesma instituição de cuidados terciários e 4 isolados de *K.pneumoniae* isolados de dois doentes. Para os 3 doentes estudados, obtiveram-se perfis electroforéticos semelhantes com a reacção de BOX PCR *fingerprinting*, dentro do mesmo doente e para as duas amostras, o que pode indicar episódios de infecções recorrentes com o mesmo clone bacteriano. Não se verificou relação clonal entre os isolados dos dois doentes da mesma instituição. Os isolados de *E.coli* do mesmo doente eram positivos para o gene *fimH* e *ecpA*, enquanto que os isolados de *E.coli* obtidos no lar eram apenas positivos para um dos genes, *fimH* num deles e *ecpA* no outro. Os isolados de *K.pneumoniae* eram positivos para todos os factores de virulência estudados *fimH*, *mrkD* e *khe*.

Em conclusão, a magnitude de infecção ou da colonização do epitélio depende não só dos factores de susceptibilidade do hospedeiro mas dos factores de virulência e da de resistência aos antibióticos das estirpes bacterianas.

Para que a prescrição empírica de antibióticos para o tratamento da ITU seja instituída o mais correctamente possível é fundamental que o clínico tenha o conhecimentos actualizado sobre quais as bactérias mais frequentemente isoladas e como estão a evoluir os perfis de susceptibilidade aos antibióticos, de modo a garantir que não haja selecção de estirpes resistentes pelo uso indevido de antibióticos.

Uma vez que a resistência dos isolados na comunidade apresenta uma tendência para aumentar, é necessária a monitorização constante e a vigilância epidemiológica de modo a evitar não só a selecção de estirpes resistentes, mas também a sua disseminação na comunidade.

Com este trabalho pretendeu-se conhecer a realidade específica da comunidade estudada de modo a futuramente poder informar os clínicos da região de modo a eles poderem fazer uma prescrição mais adequada.

5. Referências Bibliográficas

1. **McCarter YS**, Burd EM, Hall GS and Zervus M. 2009. Cumitech 2C, Laboratory Diagnosis of Urinary Tract infections. Coordinating ed., S.E.Sharp. ASM Press, Washington DC.
2. **González-Chamorro F**, Palacios R, Alcover J *et al.* La infección urinaria y su prevención. *Actas Urológicas Españolas* 2012; **36 (1)**: 48-53.
3. **Mahon CR**, Manuselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology* , ed 2, Philadelphia, 2000, Saunders.
4. **Ribeiro M**, Yano T, Leite DS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2008; **50 (5)**: 255-260.
5. **Grabe M**, Bjerklund-Johansen TE, Botto H *et al.* Guidelines on urological infections. *European Association of Urology* 2011.
6. **Hooton TM**. Pathogenesis of urinary tract infection: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; **46 (S1)**: 1-7.
7. **Johnson JR**, Owens K, Gajewski A *et al.* Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; **43 (12)**: 6064-6072.
8. **Stamm WE**. Host-pathogen interactions in community-acquired urinary tract infections. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2006; **117**: 75-84.
9. **Nicolle L**, Anderson PAM, Conly J *et al.* Uncomplicated urinary tract infection in women – current practice and the effect of antibiotic resistance on empiric treatment. *Can Fam Physician* 2006; **52**: 612-618.
10. **Dalal S**, Nicolle L, Marrs CF *et al.* Long-term *Escherichia coli* asymptomatic bacteriúria among women with diabetes mellitus. *Clinical Infectious Diseases* 2009; **49**: 491-7.
11. **Blango MG**, Mulvey M. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; **54 (5)**: 1855-1863.
12. **Lane MC**, Mobley HLT. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney International* 2007; **72**: 19-25.
13. **Wiles TJ**, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 2008; **85 (1)**: 11-19.
14. **Moreno E**, Andreu A, Pigrau C *et al.* Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cyctitis in women and the fecal *E.coli* population of the host. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; **46 (8)**: 2529-2534.
15. **Wullt B**, Bergsten G, Samuelsson M *et al.* The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2002; **19**: 522-538.
16. **Jadhav S**, Hussain A, Devi S *et al.* Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS ONE* 2011; **6 (3)**: e18063; 1-7.

17. **Chen SL**, Hung CS, Pinkner JS *et al.* Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *PNAS* 2009; **106 (52)**: 22439-22444.
18. **Wullt B**, Bergsten G, Fisher H. Application of Laboratory Research in UTI. *EAU Update Series* 2004; 116-124.
19. **Rosen DA**, Pinkner JS, Walker JN *et al.* Molecular Variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infection and Immunity* 2008; **76 (7)**: 3346-3356.
20. **Godaly G**, Svanborg C. Urinary tract infections revisited. *Kidney International* 2007; **71**: 721-723.
21. **Blackburn D**, Husband A, Saldan Z *et al.* Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E.coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; **47 (6)**: 1781-1784.
22. **Rendón M**, Saldaña Z, Erdem AL *et al.* Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *PNAS* 2007; **104 (25)**: 10637-10642.
23. **Narciso A**, Lito L, Cristino JM *et al.* *Escherichia coli* uropatogénica: resistência aos antibióticos versus factores de virulência. *Acta Urol* 2010; **27 (2)**: 11-20.
24. **Yin-Ching C**, Jer-Horng S, Ching-Nan L *et al.* Cloning of a gene encoding a unique hemolysin from *Klebsiella pneumoniae* and its potential use as a species-specific gene probe. *Microbial Pathogenesis* 2002; **33**: 1-6.
25. **Struve C**, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and Immunity* 2008; **76 (9)**: 4055-4065.
26. **Sebghati TAS**, Korhonen TK, Hornick DB *et al.* Characterization of the Type 3 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella* strains. *Infection and Immunity* 1998; **66 (6)**: 2887-2894.
27. **Ong GY**, Beatson SA, Totsika M *et al.* Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiology* 2010; **10**: 183.
28. **vanHoek AHAM**, Mevius D, Guerra B *et al.* Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front.Microbio.* 2011; 2:203: doi: 10.3389/fmicb.2011.00203.
29. **Kwan CH**, Onyett H. Community-acquired urinary tract pathogens and their resistance patterns in hospitalized children in southeastern Ontario between 2002 and 2006. *Paediatr Child Health* 2008; **13(9)**: 759-762.
30. **Garín JAL**, Santos JP, Costa MS *et al.* Evolución de la resistencia antibiótica en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. *Rev Clin Esp* 2005; **205 (6)**: 259-264.
31. **Biondo CM**, Rocha JL, Tuon FF. Fosfomycin in vitro resistance of *Escherichia coli* from the community. *Braz J Infect Dis* 2011; **15 (1)**: 96.
32. **Chang LL**, Chang TS, Chang CY. Variable gene cassette patterns of Class 1 Integron-associated drug-resistant *Escherichia coli* in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 2006; **23 (6)**: 273-280.
33. **Chang CY**, Chang LL, Chang YH *et al.* Characterisation of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. *JMed Microbiol* 2000; **49**: 1097-1102.

34. **Sabaté M**, Prats G. Estructura y function de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;**20(7)**:341-5.
35. **White PA**, McIver CJ, Rawlinson, WD. Integrons and Gene Cassettes in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; **45 (9)**: 2658-2661.
36. **Mendonça N**, Ferreira E, Louro D *et al.* Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended and broad spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; **34**: 29-37.
37. **Mendonça N**, Leitão J, Mangueiro V *et al.* Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; **51 (6)**: 1946-1955.
38. **Strahilevitz J**, Jacoby GA, Hooper DC *et al.* Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; **22 (4)**: 664-689.
39. **Silva A**, Machado P, Rodrigues V *et al.* Bactérias uropatogénicas identificadas de cistites de mulheres na comunidade. *Acta urológica* 2008; **25 (3)**: 9-14.
40. **Yang H**, Chen H, Yang Q *et al.* High Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; **52 (12)**: 4268-4273.
41. **Suárez JE**, Mendoza MC. Plasmid-Encoded Fosfomycin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991; **35 (5)**: 791-795.
42. **Falagas ME**, Kastoris AC, Kapaskelis AM *et al.* Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; **10**: 43-50.
43. **Wachino J**, Yamane K, Suzuki S *et al.* Prevalence of Fosfomycin Resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; **54 (7)**: 3061-3064.
44. **Wei Q**, Jiang X, Yang Z *et al.* *dfrA27*, a new integron-associated trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; **63**, 405–419.
45. **Levings RS**, Lightfoot D, Elbourne LDH *et al.* New Integron-associated gene cassette encoding a Trimethoprim-resistant DfrB-type dihydrofolate reductase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50 (8)**: 2863-2865.
46. **Suh DK**, Song JC. Analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolated from human and chickens by repetitive sequence-PCR fingerprinting, antibiotic resistance and plasmid profiles. *J.Vet.Sci.* 2006; **7(1)**: 37-41.
47. **Wolska K**, Kot B, Jakubczak A *et al.* BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2011; **49 (4)**: 734-738.
48. **Seurinck S**, Verstraete W, Siciliano S. Use of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; **69 (8)**: 4942-4950.
49. **CLSI**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement, vol. 30, n^o1 (M100-S20), Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Institute; 2010.

50. Speldooren V, Heym B, Labia R *et al.* Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 1998; **42 (4)**: 879-884.
51. Mercier J, Levesque R. Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 β -lactamase and cloning and sequencing of SHV-1 β -lactamase. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 1990; **34 (8)**: 1577-1583.
52. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND *et al.* β -lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 1998; **42(6)**: 1350-1354.
53. Saladin M, Cao VT, Lambert T *et al.* Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters* 2002; **209**: 161-168.
54. Lévesque C, Piché L, Laore S *et al.* PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 1995; **39 (1)**: 185-191.
55. Marklund BI, Tennent JM, Garcia E *et al.* Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* *pap* and *prs* pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties. *Mol Microbiol.* 1992; **6(16)**:2225-42.
56. Riosa S, Trautner BW, Hull, RA Sequence of the *fim* operon of *E.coli* 83972.
57. NCBI Reference Sequence: NC_012731.1 *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 chromosome, complete genome.
58. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in Pathogenicity. *Infection and Immunity* 2009; **77(11)**: 5016-5024.
59. Shen P, Jiang Y, Zhou Z *et al.* (2008). Complete nucleotide sequence of pKP96, a 67850 pb multiresistance plasmid encoding *qnrA1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-24}* from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; **62 (6)**: 1252-1256.
60. Avgustin JA, Keber R, Zerjavic K *et al.* Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; **51 (11)**: 4171-4173.
61. Chen YT, Shu HY, Li LH *et al.* Complete Nucleotide Sequence of pk245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum- β -Lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50(11)**: 3861-3866.
62. Jacoby G, Walsh KE, Mills DM *et al.* *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50 (4)**: 1178-1182.
63. Tikoo A, Tripathi AK, Verma SC *et al.* Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of *Salmonella* isolates. *Current science* 2001; **80(8)**: 1049-1052.
64. Navarro F, Calvo J, Cantón R *et al.* Detección fenotípica de mecanismos de resistência en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2011; **29(7)**: 524-534.
65. Gude MJ, Seral C, Sáenz Y *et al.* Evaluation of four phenotypic methods to detect plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; DOI: 10.1007/s10096-011-1537-y

66. **Mendes RE**, Castanheira M, Pignatari ACC *et al.* Metallo- β -lactamases. *J Bras Patol Med* 2006; 42(2): 103-113.
67. **Drieux L**, Brossier F, Sougakoff W *et al.* Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14(S1): 90-103
68. **Tsakris A**, Poulou A, Themeli-Digalaki K *et al.* Use of Boronic Acid Disk Tests to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; **47(11)**: 3420–3426
69. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Antimicrobial resistance in Europe 2010. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS_Net). Stockholm; ECDC; 2011.
70. **Schroll C**, Barken KB, Krogfelt KA *et al.* Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology* 2010; **10:179** <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/179>