

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À
FOSFOMICINA EM BACTÉRIAS
UROPATOGÉNICAS**

Ana Rita da Cruz Narciso

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À FOSFOMICINA EM BACTÉRIAS UROPATOGÉNICAS

Dissertação orientada por Prof^a. Aida Duarte (iMed.UL – FFUL)

e Prof. Francisco Dionísio (FCUL)

Ana Rita da Cruz Narciso

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011



MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À FOSFOMICINA EM BACTÉRIAS UROPATOGÉNICAS

Ana Rita da Cruz Narciso

TESE DE MESTRADO

2011

Esta tese foi realizada no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa sob a orientação directa da Prof^a. Aida Duarte.

O Prof. Francisco Dionísio foi o orientador interno designado no âmbito do *Mestrado em Microbiologia Aplicada* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

À Professora Aida Duarte, pela oportunidade de aprender e evoluir sob a sua orientação durante os últimos dois anos, assim como pelo apoio prestado durante a realização deste trabalho.

À Zambon – Produtos Farmacêuticos, Lda., por ter proporcionado o estudo da susceptibilidade aos antibióticos em infecções urinárias da comunidade em Portugal e pela ajuda dada na fase inicial deste trabalho.

A todos os colegas e amigos que passaram pelo Laboratório 125 e que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, quer por colaboração directa, quer pela amizade, disponibilidade e companheirismo, nomeadamente Sofia Cerqueira, Filipa Fonseca, Ana Eusébio e Nuno Ribeiro. Um agradecimento especial à Filipa Calisto e à Paula Machado, pela força e motivação que sempre me transmitiram.

À minha família e amigos, pelo apoio, amizade e paciência que demonstraram, sem os quais teria sido impossível terminar este trabalho.

Resumo

A fosfomicina trometamol é um antibiótico cujas propriedades farmacodinâmicas e cinéticas tornam-no particularmente eficaz no tratamento de infecções urinárias, as infecções bacterianas mais frequentes. Este estudo teve como objectivo conhecer e caracterizar os mecanismos de resistência à fosfomicina, assim como a resistência associada a outros antibióticos, de modo a explicar e viabilizar este antibiótico como alternativa no tratamento de infecções urinárias.

Foram estudados inicialmente 533 isolados bacterianos de Gram negativo provenientes de urinas analisadas em laboratórios da comunidade e seleccionado um grupo de 23 isolados para prosseguir com a caracterização molecular da resistência aos antibióticos. O perfil de susceptibilidade aos antibióticos foi obtido por método de difusão em disco e a Concentração Mínima Inibitória da fosfomicina por E-test. Os genes de resistência foram pesquisados por PCR, os plasmídeos agrupados por *Replicon Typing* e o perfil genómico por ERIC-PCR. O transporte da fosfomicina foi avaliado usando meios mínimos com o substrato de cada transportador como única fonte de carbono.

E. coli foi o agente etiológico com maior prevalência. No grupo heterogéneo de 533 bactérias, a susceptibilidade à fosfomicina foi superior a 90%. Nos 23 isolados caracterizados molecularmente, a resistência deu-se essencialmente por alterações no transporte da fosfomicina (14 em 23), mutações estas que afectam o *fitness* bacteriano *in vivo*, apesar do gene *fosA* estar presente em 10 isolados. No entanto, a presença deste gene em isolados sem alterações no transporte do antibiótico não foi suficiente para causar resistência. Não parece haver resistência cruzada com outras classes de antibióticos, o que pode estar relacionado com a resistência ser maioritariamente cromossomal.

Estes resultados demonstram o potencial que este antibiótico pode ter na era da resistência globalizada a várias classes de antimicrobianos, nomeadamente β -lactâmicos, quinolonas e trimetoprim/sulfametoxazole, não só no tratamento de infecções urinárias, mas para além do tracto urinário.

Abstract

Fosfomicin tromethamol is an antibiotic which has pharmacodynamic and pharmacokinetic properties that make it particularly effective in the treatment of urinary infections, the most common bacterial infections. The aim of this study was to know and characterize fosfomicin resistance mechanisms, as well as associated resistance to other antibiotics, to explain the high susceptibility rates and validate this antibiotic has an alternative for the treatment of urinary infections.

Initially, 533 bacterial isolates sampled from urine at community laboratories were studied and a group of 23 isolates was then selected to proceed with the molecular characterization of antibiotic resistance. The antibiotic susceptibility profile was obtained through disk-diffusion method and Minimum Inhibitory Concentrations of fosfomicin through E-test method. Resistance genes were investigated through PCR, plasmids were grouped using the *Replicon Typing* method and genomic profiles through ERIC-PCR. Fosfomicin transport was evaluated using minimal media with the substrate of each transporter as sole carbon source.

E. coli was the most prevalent etiologic agent. In the heterogeneous group of 533 bacteria, susceptibility to fosfomicin was higher than 90%. In the 23 isolates molecularly characterized, resistance was essentially due to alterations in fosfomicin transport (14 in 23), mutations that affect bacterial fitness *in vivo*, although the *fosA* gene was present in 10 isolates. However, the presence of this gene alone in isolates without transport alterations was not sufficient to cause resistance. Crossed resistance with other antibiotic classes does not seem to occur, which can be related to the fact that fosfomicin resistance is mainly chromosomal.

These results show the potential that this antibiotic may have in the age of globalized resistance to several classes of antimicrobials, namely β -lactams, quinolones and trimethoprim/sulphamethoxazole, not only in urinary infections, but also beyond the urinary tract.

Índice

1. Introdução.....	2
1.1 Infecções urinárias	2
1.2 Resistência aos antibióticos	3
1.3 Características da fosfomicina	5
1.4 Mecanismos de resistência à fosfomicina.....	6
2. Materiais e métodos	11
2.1 Amostras	11
2.2 Estudo da susceptibilidade aos antibióticos.....	11
2.3 Caracterização fenotípica da resistência à fosfomicina – Utilização de fontes de carbono.....	12
2.4 Caracterização molecular – Detecção de fosA, perfis genómicos e resistência associada a outras classes de antibióticos	12
3. Resultados e Discussão	17
3.1 Amostras	17
3.2 Estudo da susceptibilidade aos antibióticos.....	17
3.3 Caracterização fenotípica da resistência à fosfomicina – utilização de fontes de carbono.....	24
3.4 Caracterização molecular – Detecção de fosA, perfis genómicos e resistência associada a outros antibióticos	27
3.5 Relação entre a CMI da fosfomicina e os mecanismos de resistência.....	32
4. Conclusão.....	34
5. Bibliografia.....	36

1. Introdução

1.1 Infecções urinárias

As infecções do tracto urinário (ITUs) são as infecções bacterianas mais comuns, quer na comunidade quer no meio hospitalar. Estas infecções são uma das principais causas de morbidade, mortalidade e custos associados aos cuidados de saúde [1,2].

As mulheres são mais afectadas por este tipo de infecções devido às características anatómicas do seu aparelho genito-urinário, principalmente mulheres jovens sexualmente activas, grávidas ou no período pós-menopausa. Estima-se que cerca de 40 a 50% de toda a população feminina adulta tenha uma pelo menos uma infecção urinária ao longo a sua vida [2].

Enquanto ITUs não complicadas, ou seja, infecções que ocorrem em tractos urinários normais sem qualquer tipo de instrumentalização, surgem particularmente em mulheres saudáveis adultas, as infecções complicadas podem ocorrer em ambos os sexos e em diferentes grupos etários e estão frequentemente associadas a anomalias estruturais ou funcionais do tracto genito-urinário (tais como cálculos renais, bexiga neurogénica, presença de cateteres uretrais, obstrução, imunossupressão, falha renal, transplante renal e gravidez). ITU em populações idosas é geralmente complicada, tal como em homens com hipertrofia prostática e em mulheres pós-menopausa. A probabilidade de falha no tratamento, complicações graves e desenvolvimento de resistência aos antibióticos é mais comum em infecções complicadas [3].

Escherichia coli é o agente etiológico mais frequentemente associado a infecções urinárias, sendo responsável por 70 a 95% dos casos. *Staphylococcus saprophyticus* está normalmente associado a 5-20% das infecções na comunidade. Outras bactérias do grupo das *Enterobacteriaceae* também são agentes comuns, como *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp., e de entre as bactérias de Gram positivo, *Enterococcus* spp. é também isolado com frequência [4,5,6].

Um dos problemas associado com o tratamento de infecções urinárias é resistência aos antibióticos, nomeadamente aos β -lactâmicos, quinolonas e trimetoprim/sulfametoxazole, que dificultam o tratamento geralmente empírico aplicado nas ITUs.

1.2 Resistência aos antibióticos

A emergência de resistência aos antibióticos deu-se ainda antes do primeiro antibiótico, a penicilina, descrita por Alexander Fleming em 1928, ter sido desenvolvido e introduzido na prática clínica. A primeira β -lactamase, enzima capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico deste antibiótico, foi identificada em *E. coli* em 1940 [7]. A era da penicilina deu origem à rápida emergência de resistência em *Staphylococcus aureus* devido à presença de uma penicilinase plasmídica que rapidamente se disseminou para outras espécies do género *Staphylococcus*.

Muitos géneros bacterianos possuem uma β -lactamase codificada no cromossoma, mas a primeira β -lactamase plasmídica, TEM-1, foi descrita no início dos anos 60 e pertencia a uma estirpe de *E. coli* isolada a partir de uma hemocultura. Poucos anos após ter sido isolada, espalhou-se pelo globo e pode ser encontrada em vários membros da família das *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenza* e *Neisseria gonorrhoea* [8]. A emergência de resistência plasmídica tornou-se problemática devido ao seu potencial disseminativo.

Nos últimos 20 anos foram desenvolvidos diversos antibióticos da classe dos β -lactâmicos especificamente criados para resistirem à acção hidrolítica das β -lactamases. No entanto, com cada nova classe que surge, novas β -lactamases são encontradas, capazes de conferir resistência, presumivelmente devido à pressão selectiva causada pelo uso abusivo destes novos antibióticos na terapêutica, o que demonstra a elevada capacidade de adaptação bacteriana. Uma das novas classes criadas foram as oxiamino-cefalosporinas, ou cefalosporinas de espectro alargado, cujo uso foi introduzido em 1980. Esta nova classe de β -lactâmicos era eficaz contra a maioria das bactérias produtoras de β -lactamases e tinha a vantagem de ter menores efeitos nefrotóxicos, quando comparada com os aminoglicosídeos. A resistência a esta classe surgiu rapidamente, devido à disseminação de β -lactamases de espectro alargado (*Extended-Spectrum β -lactamases*, ESBLs), caracterizadas pela sua capacidade de hidrolisar cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e monobactams, mas não cefamicinas ou carbapenemos, e que são inibidas por inibidores de β -lactamases como o ácido clavulânico. A primeira ESBL descrita, SHV-2, possuía apenas a diferença de um aminoácido para a sequência de SHV-1 (β -lactamase de espectro restrito) e desde então centenas de variantes ESBL do tipo TEM e SHV já foram descritas. Diferenças em aminoácidos específicos alteram o espectro de actividade destas enzimas [9].

Até ao fim dos anos 90, as ESBLs detectadas pertenciam aos tipos TEM e SHV (essencialmente ceftazidimases), mas durante os anos 2000, as enzimas CTX-M tornaram-se predominantes. Este tipo de enzimas, ao contrário das SHV e TEM, tem uma maior actividade hidrolítica (cerca de 35 vezes superior) contra a cefotaxima do que contra a ceftazidima, sendo assim consideradas cefotaximases. No entanto, novas variantes com elevada actividade para ambos antibióticos já existem (como, por exemplo, CTX-M-15) [10,11]. Microorganismos que

produzem enzimas do tipo CTX-M tornaram-se o grupo mais prevalente nos últimos anos, particularmente em alguns países da Europa e da América do Sul [12]. Uma das possíveis explicações para a disseminação dos genes que codificam para β -lactamases do tipo CTX-M na comunidade é a sua associação com elementos móveis, como a sequência de inserção ISECP1 [13].

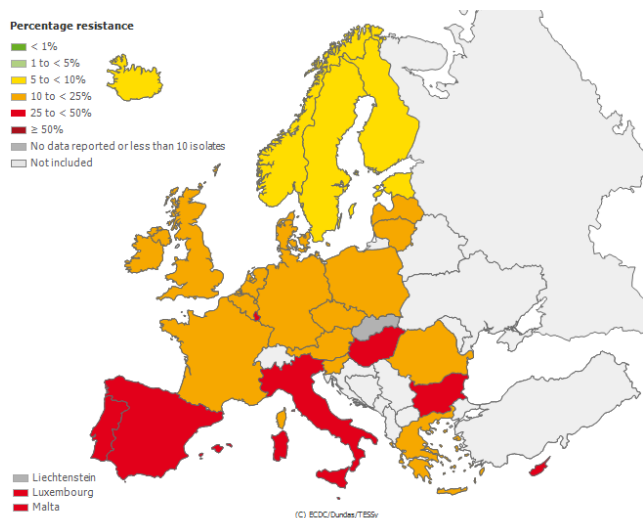
Em Portugal, a prevalência de *E. coli* produtora de β -lactamases tem vindo a aumentar, com predominância de enzimas CTX-M-type a causar infecções do tracto urinário adquiridas na comunidade. Estudos em hospitais portugueses demonstram a disseminação de CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32, TEM-24, TEM-52, GES e SHV-12 [14].

Os carbapenemos surgem então como alternativa a estirpes produtores de ESBLs, mas rapidamente surgiram diversos mecanismos de resistência, como modificações na permeabilidade ou sistemas de efluxo, hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC (cefalosporinases não inibidas pelo ácido clavulânico) ou ESBLs, ou por fim β -lactamases capazes de hidrolisar carbapenemos (carbapenemases) [15]. As carbapenemases encontradas na família *Enterobacteriaceae* podem ser metalo- β -lactamases (VIM, IMP), oxacilinases (OXA) de espectro alargado ou β -lactamases inibidas pelo ácido clavulânico. Neste último grupo estão incluídas as KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases), já disseminadas globalmente, incluindo em Portugal (referência ECCMID). Mais recentemente foi descrita uma metalo- β -lactamase capaz de conferir resistência a vários subgrupos de β -lactâmicos e que têm preocupado as autoridades internacionais, NDM-1, que já está disseminada por diversos géneros bacterianos e em vários países, mas que, até à data, ainda não foi descrita em Portugal [16].

As quinolonas são outro grupo de antibióticos muito usado no tratamento de infecções por microrganismos de Gram negativo, principalmente quando se tratam de infecções urinárias, tendo-se verificado que actua essencialmente sobre a DNA girase, enquanto nos microrganismos de Gram positivo o alvo é principalmente a topoisomerase IV. A resistência a estes antibióticos pode ser conferida tanto por mutações nos genes codificantes das subunidades da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (*parC* e *parE*) como por genes plasmídicos como *qnrA*, *B* ou *S* e *aac(6')-Ib-cr* [17].

A resistência aos antibióticos em bactérias uropatogénicas tem aumentado significativamente nos últimos anos. Portugal tinha em 2009, de acordo com o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), uma das taxas de *E. coli* resistentes às quinolonas mais elevadas da Europa (29%) (Figura 1). O aumento da resistência às quinolonas está também associado a uma resistência cruzada a outras classes de antibióticos, nomeadamente β -lactâmicos e à associação trimetoprim/sulfametoxazole. A selecção de estirpes resistentes com elevada prevalência na comunidade pode estar relacionada com o uso frequente e indiscriminado destes antibióticos usualmente utilizados na terapêutica quer de infecções urinárias quer respiratórias.

a) *E. coli*



b) *K. pneumoniae*

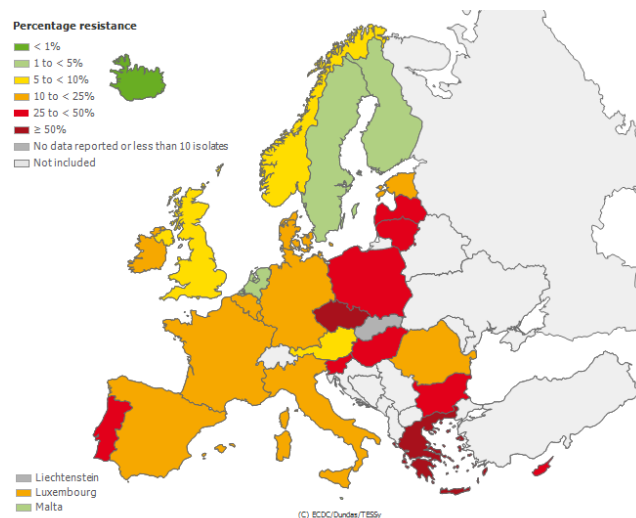


Figura 1. Percentagem de resistência às fluoroquinolonas na Europa em 2009. Mapas disponíveis em <http://www.ecdc.europa.eu/>, acedido a 23/06/2011

O crescente aumento a diversas classes de antibióticos cria uma necessidade de reavaliar as escolhas para terapêutica. Mesmo antibióticos utilizados como última alternativa como os carbapenemos começam a ser ineficazes. Novos antibióticos tardam a surgir, pelo que o recurso a antibióticos “esquecidos” pode providenciar uma alternativa.

A fosfomicina é um antibiótico cuja resistência, apesar de existir há várias décadas, não tem aumentado, e não se tem verificado resistência cruzada com outras classes de antibióticos.

1.3 Características da fosfomicina

A fosfomicina [ácido L-(*cis*)-1,2-epoxipropilfosfónico, $C_3H_7PO_4$] foi descoberta em 1969, sendo um metabolito secundário de várias espécies de *Streptomyces* [18]. Esta molécula, único membro da sua classe, despertou muito interesse na altura da sua descoberta, devido à sua estrutura nova (Figura 2) e ao seu modo de acção pois actua como um análogo do fosfoenolpiruvato, ligando-se à UDP-N-acetilglucosamina-3-O-enolpiruvil transferase (enolpiruvil transferase, MurA), enzima que catalisa a primeira reacção na síntese do peptidoglicano, ainda no citoplasma bacteriano, inibindo assim este processo em passos anteriores aos β -lactâmicos ou glicopéptidos [19]. Este antibiótico apresenta um espectro alargado, cobrindo várias bactérias de Gram positivo (como *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp.) e de Gram negativo (como *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae*), assim como anaeróbios [20], tem baixa toxicidade

[18,21], não apresenta resistência cruzada com outras classes de antibióticos mas demonstra sinergismo no tratamento de bactérias de Gram negativo e positivo [22].

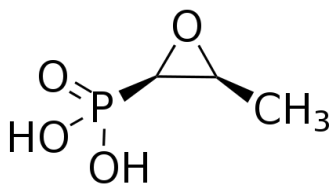


Figura 2. Estrutura química da fosfomicina

A sua associação com o sal de trometamol é particularmente eficaz no tratamento de infecções urinárias, devido às suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Não é inativada pela acidez estomacal, têm uma elevada biodisponibilidade e uma dose oral única de 3g permite atingir concentrações na urina de 1053-4415 mg/L quatro horas após administração (uma concentração 350 vezes superior à mínima necessária para a inibição de *Escherichia coli*), permanecendo a concentração superior a 128 mg/L 48 a 72 horas, o que facilita a eliminação do agente etiológico e impede a selecção de microrganismos multirresistentes [20,23]. O facto de este antibiótico necessitar apenas de uma dose única tem várias vantagens, nomeadamente uma adesão superior do doente à antibioterapia, menos alterações na flora do tracto gastrointestinal e menos efeitos secundários [24].

Existe ainda fosfomicina intravenosa, sob a forma de sal de disódio, prescrita em vários países no tratamento de infecções para além do tracto urinário. A experiência clínica é geralmente favorável. Estudos demonstram que a administração intravenosa de diferentes doses de fosfomicina resulta na obtenção de concentrações clinicamente relevantes em vários locais, tal como os tecidos moles, ossos, pulmões, líquido cefaloraquidiano e válvulas cardíacas. Além disso, tem uma boa penetração e actividade antimicrobiana em biofilmes. Estes resultados demonstram que a fosfomicina intravenosa pode ser relevante no tratamento de infecções sistémicas causadas por microrganismos multirresistentes [23].

1.4 Mecanismos de resistência à fosfomicina

A resistência à fosfomicina já foi descrita como ocorrendo por três mecanismos diferentes: (i) impermeabilidade devendo-se a mutações cromossomais que afectam os mecanismos de transporte da glucose-6-fosfato ou o glicerol-3-fosfato, (ii) resistência plasmídica por produção de enzima que inactiva a fosfomicina e (iii) modificação do alvo MurA.

(i) Impermeabilidade

A fosfomicina chega ao citoplasma bacteriano através de dois sistemas possíveis de transporte activo de nutrientes. A entrada principal dá-se por transporte através do transportador parcialmente constitutivo de glicerol-3-fosfato (GlpT), tendo sido demonstrado pela descoberta que mutantes GlpT⁻ são resistentes a este antibiótico e, por outro lado, mutantes que produzem constitutivamente este transportador são hipersusceptíveis. Um transporte alternativo ocorre através do sistema de *uptake* de hexoses fosfato (UhpT), que é induzido na presença de glucose-6-fosfato [19,25]. A expressão destes transportadores é induzida pelos seus substratos e requer a presença da associação AMP cíclico – proteína receptora (cAMP-CRP), estando assim sujeitos a repressão catabólica. Adicionalmente, a expressão de UhpT requer ainda a presença dos genes de regulação *uhpA*, *uhpB* e *uhpC* [26].

Mutações que afectam o transporte da fosfomicina para o citoplasma afectam a susceptibilidade a este antibiótico. Estas mutações ocorrem essencialmente no gene *glpT*, mas já foram descritas mutações *uhpA*, que regula a transcrição de *uhpT*, e em *ptsI* e *cyaA*, genes envolvidos na manutenção dos níveis celulares de cAMP, também associadas a uma diminuição da susceptibilidade [27,28].

Em *Pseudomonas aeruginosa*, GlpT foi descrito como sendo o único transportador para a fosfomicina, pois este microrganismo não tem nenhum transporte específico para a glucose-6-fosfato nem possui o gene *uhpT* que codifica para o transportador alternativo da fosfomicina noutros géneros bacterianos [26].

O facto de esta resistência poder ocorrer por diferentes alvos cromossomais está associado a elevadas taxas de mutação espontânea *in vitro* na presença de fosfomicina, tal como se pode verificar pelo aparecimento de colónias translúcidas dentro do halo de inibição aquando do teste de susceptibilidade por difusão de disco em meio de Mueller-Hinton ou mesmo por E-test. Esta elevada taxa de mutação foi descrita inicialmente em 1975 [29] e mais tarde foi confirmado que estes mutantes eram essencialmente deficientes no transporte de glicerol-3-fosfato [30]. Este facto levou a que os métodos para estudar a susceptibilidade à fosfomicina fossem revistos. Andrews *et al*, em 1983, verificaram que o melhor método para mimetizar as condições *in vivo* e diminuir o número de mutantes espontâneos seria adicionar 50 µg de glucose-6-fosfato ao disco de fosfomicina, assim como suplementar o meio de Mueller-Hinton com 25 µg/mL do mesmo composto, pois este composto induz a produção do transportador alternativo UhpT o que permitiria induzir susceptibilidade em mutantes espontâneos GlpT⁻ [31]. *In vivo*, glucose-6-fosfato está presente onde existir glicólise, pelo que testes *in vitro* sem a sua adição são desajustados. Como a concentração *in vitro* não pode ser prevista com precisão, os testes foram estandardizados usando a concentração óptima de 25 µg/mL, sendo que concentrações superiores não influenciaram significativamente os resultados. As normas do

CLSI (*Clinical Laboratories Standards Institute*) também já recomendam estes procedimentos [32].

No entanto, apesar de se verificarem elevadas taxas de mutação *in vitro*, a resistência a este antibiótico em isolados clínicos mantém-se reduzida. Nilsson *et al* explicam esta contradição através do custo biológico que estas mutações têm em *E. coli* [33]. Mutações que afectem o metabolismo de carbono podem levar a uma incapacidade de crescer em fezes, o que pode resultar a dificuldades no estabelecimento no hospedeiro e, sendo assim, não poderão ser transmitidas a partir do intestino e causar uma infecção urinária o que, conseqüentemente, diminuiria o *fitness* biológico da bactéria. De facto, estes autores não detectaram mutações em *cyaA in vivo*, pois esta mutação está associada à diminuição de AMP cíclico, o que afectaria seriamente a capacidade de crescimento bacteriano. Li Pira e colegas demonstraram que a fosfomicina diminui a adesão bacteriana, o que pode também afectar o desenvolvimento de resistência *in vivo* [34]. Por outro lado, mutações associadas à resistência a este antibiótico por redução do cAMP (genes *cyaA* e *ptsI*) também afectam a adesão por redução da biossíntese de pilus bacteriano [33]. Todos os factores afectam a capacidade de estabelecimento e o *fitness* bacteriano, pelo que a sua ocorrência *in vivo* é diminuída.

(ii) Resistência plasmídica

O primeiro determinante de resistência à fosfomicina contido em plasmídeos (Fo^r) foi descrito apenas em 1980 por Mendoza *et al*, em estirpes de *Serratia marcescens* isoladas em Espanha no ano de 1975, país onde a fosfomicina era extensamente usada desde 1971 [35]. Fo^r foi detectado em dois plasmídeos diferentes, pertencendo aos grupos de incompatibilidade L/M e C. Em 1982, García-Lobo & Ortiz descreveram este determinante como estando contido, pelo menos num dos casos, num transposição ($Tn2921$) [36,37]. No entanto, o mecanismo de acção deste determinante só foi identificado em 1988 por Arca *et al*, tendo sido verificada a reacção da fosfomicina com o tripéptido glutatona, inactivando-a por abertura do anel epóxido através da ligação ao aminoácido cisteína contido na glutatona (Figura 3), postulando-se que um gene codificante para uma glutatona-S-transferase seria o determinante plasmídico de resistência Fo^r [38]. Este facto era suportado pela existência de células com o plasmídeo contendo Fo^r , mas incapazes de sintetizar glutatona que apresentavam susceptibilidade ao antibiótico. A presença desta enzima foi confirmada quando o mesmo grupo purificou uma glutatona-S-transferase que medeia esta reacção e cuja actividade é aumentada na presença dos catiões Fe^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} [39]. Esta enzima foi mais tarde denominada FosA.

Desde então, o gene *fosA* foi detectado em várias bactérias do grupo das *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. É de notar que, apesar de possuírem a mesma designação, estas enzimas possuem diferenças ao nível da sequência nucleotídica. Nos

últimos dois anos, variantes desta enzima já foram encontradas. O gene *fosA2* foi detectado em *Enterobacter cloacae*, com uma homologia aminoacídica de 95% com FosA [40] e *fosA3* foi detectado em *E. coli*, tendo uma homologia aminoacídica de 80% com FosA [41].

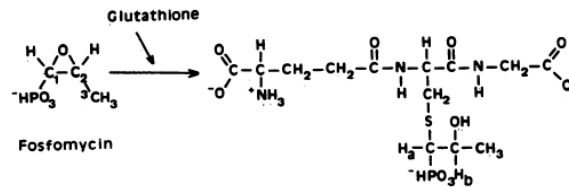


Figura 3. Representação da reacção da fosfomicina com a glutatona [38].

Em 1990, Zilhão & Courvalin descreveram *fosB* em *Staphylococcus epidermidis*, gene que codifica uma enzima que confere resistência à fosfomicina e que desde então apenas foi identificada em bactérias de Gram positivo, tal como *fosA* apenas foi encontrado em bactérias de Gram negativo. As bactérias de Gram positivo não produzem níveis detectáveis de glutatona, pelo que a presença de FosA seria irrelevante. FosB é uma tiol-transferase dependente de Mg²⁺, actuando de forma semelhante a FosA, mas usando o aminoácido cisteína, em vez da glutatona, como co-factor (Figura 4) [42,43].

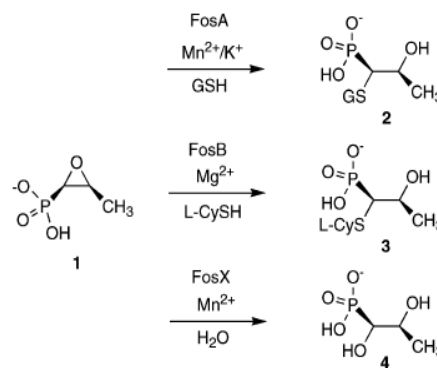


Figura 4. Modificação enzimática da fosfomicina [44]

Em 1995, um terceiro gene, *fosC*, identificado em *Pseudomonas syringae*, foi descrito como codificando um produto que medeia a resistência à fosfomicina usando ATP como co-substrato e funcionando como fosfotransferase [45]. Esta bactéria tem uma particularidade: é produtora de fosfomicina, pelo que García *et al* postulam que FosC possa actuar em passos iniciais da biossíntese deste antibiótico, tendo um papel na desintoxicação intracelular de *P. syringae*, o que poderia explicar o facto de esta enzima conferir baixos níveis de resistência quando transferida para *E. coli*.

Por fim, foi descrita em 2007 uma enzima que conferia resistência à fosfomicina em *Listeria monocytogenes*, FosX, mas que é codificada no genoma desta bactéria, e não em plasmídeos. Esta enzima, dependente de Mg^{2+} , actua de forma semelhante a FosA e FosB (Figura 4), mas usando H_2O como co-factor, quebrando o anel epóxido e hidratando a molécula. Genes codificando homólogos de FosX já haviam sido descritos nas bactérias ambientais *Mesorhizobium loti* e *Desulfitobacterium hafniense* e patogénicas *Brucella melitensis* e *Clostridium botulinum* [44].

(iii) Alteração do alvo MurA

Já foram descritas mutações no gene *murA*, que codifica a enolpiruvil transferase alvo da fosfomicina, que tornam o microrganismo resistente ao antibiótico. Substituições no centro activo de cisteína (Cys115) para aspartato em MurA conferem resistência intrínseca em *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Vibrio fischeri* [46,47,48] e tornam *E. coli* resistente quando clonadas neste microrganismo, pois é neste local que a fosfomicina se liga a MurA. No entanto, estas mutações ainda não foram descritas como ocorrendo naturalmente noutros microrganismos, pelo que a grande maioria dos mecanismos de resistência detectados são os que afectam os sistemas de transporte de fosfomicina para o citoplasma. Alguns autores descrevem em *E. coli* resistente à fosfomicina outras mutações que não ocorrem neste centro activo, mas não explicam em que sentido estas mutações afectam a ligação do antibiótico a MurA [28].

Os mecanismos de acção da fosfomicina, aliados ao facto de a maioria da resistência surgir por mutações cromossomais diminui a resistência cruzada com antibióticos de outras classes. Em Portugal, a resistência à fosfomicina em bactérias uropatogénicas da comunidade têm-se mantido diminuída [6], o que torna este antibiótico uma opção no tratamento empírico de infecções urinárias na comunidade.

As *guidelines* europeias e mundiais [32,49,50] recomendam o uso da fosfomicina trometamol apenas em infecções urinárias não complicadas causadas por *E. coli* e *Enterococcus faecalis*. No entanto, o aumento da resistência a outras classes de antibióticos já referidas, nomeadamente em *Klebsiella pneumoniae*, leva à revisão das opções terapêuticas disponíveis.

Tendo estes factores em conta, o objectivo deste estudo foi conhecer e descrever os mecanismos de resistência à fosfomicina em Portugal, assim como a resistência associada a outros antibióticos, de modo a viabilizar este antibiótico como alternativa no tratamento de infecções urinárias não só causadas por *E. coli*, mas também por outras bactérias de Gram negativo.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras

Foram estudadas 533 bactérias de Gram negativo isoladas de urinas de mulheres com infecções urinárias, provenientes de 10 Laboratórios de Análises Clínicas de prestação de serviços à comunidade situados em diferentes regiões de Portugal. As estirpes foram identificadas nos laboratórios de origem e posteriormente enviadas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, entre Fevereiro e Março de 2010.

2.2 Estudo da susceptibilidade aos antibióticos

(i) Perfil de susceptibilidade em 533 isolados

O estudo da susceptibilidade aos antibióticos foi efectuado pelo método de difusão em disco (Kirby-Bauer) em meio Müller-Hinton, e interpretado de acordo com os critérios do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) [32], com discos de amoxicilina (25 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), cefuroxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), fosfomicina (50 µg), nitrofurantoína (300 µg) e trimetoprim/sulfametoxazole (1,25/23,75 µg) (BioRad).

(ii) Selecção de isolados com susceptibilidade diminuída à fosfomicina

Após leitura destes resultados, foram seleccionados 83 isolados de acordo com a sua resistência à fosfomicina, tendo sido excluídas bactérias com um halo superior a 20 mm para este antibiótico. Nesta selecção foi ainda estudada a susceptibilidade com discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), imipenemo (10 µg), gentamicina (10 µg), levofloxacina (5 µg), minociclina (30 µg), tigeciclina (15 µg), fosfomicina (200 µg), colistina (10 µg), aztreonam (30 µg) e cefepima (30 µg) (BioRad).

Foram então escolhidas 23 bactérias para prosseguir o estudo, com base na sua resistência à fosfomicina, assim como presença de multiresistência a outras classes de antibióticos.

Em estirpes cujo halo ao imipenemo apresentava susceptibilidade reduzida (indicativo da possibilidade de presença de carbapenemases ou metalo- β -lactamases) foi ainda verificada a susceptibilidade a este antibiótico na presença de inibidores destas enzimas, ácido borónico e EDTA, respectivamente.

Para obtenção de concentrações mínimas inibitórias (CMI) à fosfomicina nestas 22 bactérias, foi utilizado o método de E-test (bioMérieux) em meio de Muëller-Hinton suplementado com 25 μ g/mL de glucose-6-fosfato, tal como indicado nas normas CLSI [32]. Tendo em conta que estas *guidelines* apenas fornecem *breakpoints* de susceptibilidade à fosfomicina para os isolados de *Escherichia coli*, estes *breakpoints* foram generalizados para o resto dos isolados e comparados com os fornecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) [49] e pela *British Society of Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) [50].

2.3 Caracterização fenotípica da resistência à fosfomicina – Utilização de fontes de carbono

Utilizou-se M9 minimal salts agar suplementado com glucose-6-fosfato (G6P) ou *sn*-glicerol-3-fosfato (G3P) a 0,2% (w/v) (Sigma-Aldrich) para detectar mutações nos transportadores respectivos, usando meio Plate Count Agar (PCA) como controlo positivo [28]. As bactérias foram crescidas *overnight* em meio de Muëller-Hinton agar, suspensas em água destilada estéril e depois plaqueadas nos meios selectivos através de um aparelho Stiers (Black & Decker), que permite colocar gotas de diferentes suspensões bacterianas na mesma placa. As placas foram colocadas a 37°C durante 48h. Fraco crescimento sem formação de colónias foi considerado negativo.

2.4 Caracterização molecular – Detecção de *fosA*, perfis genómicos e resistência associada a outras classes de antibióticos

Extraiu-se o DNA total de cada isolado utilizando o método de *boiling-centrifugation*, que consiste na lise celular pelo calor de uma suspensão bacteriana densa, a 94°C durante 10 minutos, seguida da remoção dos resíduos celulares por centrifugação a 12 000 rpm durante 2 minutos, recolhendo-se o sobrenadante, tal como descrito por Brízio *et al*, 2006 [51]. O produto de extracção foi usado para todas as reacções de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

A detecção do gene *fosA* foi efectuada através de PCR usando 3 pares de primers específicos, para espécies bacterianas diferentes e confirmada por sequenciação. Para as reacções de PCR foi usada a DyNAzyme™ II PCR Master Mix (Frlabo). Para identificar o gene encontrado em *Klebsiella pneumoniae*, usaram-se os primers fosA-F (5'-GGACTGAATCACCTGACCCT-3')

e fosA-R (5'-AACACCATCCCCTTATACGG-3'). Para detectar o gene encontrado no transposão Tn2921 de *Serratia marcescens* e a variante fosA2 detectado em *Enterobacter cloacae* (que possuem uma homologia aminoacídica de 95% [41]), foram utilizados os primers fosA2-F (5'- GCAATCACTCAACCATCTGA-3') e fosA2-R (5'-TCGTCTGAGGTRAASACCAT-3'). Para pesquisar a variante de fosA detectada em *E. coli*, usaram-se os primers fosA3-F (5'-GGGATTGAATCATCTGACGC-3') e fosA3-R (5'-TCAAAAAGACCATCCCCTT-3'). O programa de PCR consistiu numa desnaturação inicial de 94°C, 5 min, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C e 2 min a 72°C, com uma extensão final de 72°C durante 8 min.

Para a electroforese, foi usado gel de agarose a 1% e tampão TAE 1x. As condições usadas foram 200 volts, 250 mAmperes durante 1 hora. Os resultados positivos foram confirmados por sequenciação. Os produtos de PCR foram purificados usando o kit de purificação *JETQUICK Spin Column Technique* (GENOMED) e enviados para sequenciação para a Macrogen, Coreia do Sul. As sequências nucleotídicas e aminoacídicas foram analisadas utilizando o software BLAST (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CLUSTALW (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Tipificação molecular

O perfil genómico bacteriano foi obtido através da técnica de ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*), de acordo com o protocolo descrito por Adamus-Bialek *et al*, 2009 [52]. Foi usada Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix (Invitrogen) na reacção de PCR, com os primers ERIC-F (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC-R (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). As condições de PCR usadas foram: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C, 0,5 min, 51,2°C, 1 min e 72°C, 2 min, com uma extensão final a 72°C durante 5 min [52]. Para a electroforese, foi usado tampão TAE (Tris Acetato EDTA) a 0,5x e gel de agarose a 2%. As condições usadas foram 150 volts, 300 mAmperes durante 2 horas.

Resistência associada a outras classes de antibióticos

Foi ainda estudada a presença de outros mecanismos de resistência, nomeadamente a antibióticos β-lactâmicos, através de PCR com primers e programas específicos e confirmado por sequenciação. Os primers e programas utilizados estão representados na Tabela I. OS reagentes e as condições de electroforese usadas, assim como o procedimento relativo à sequenciação, foram semelhantes às descritas para fosA.

Plasmídeos

Os plasmídeos foram agrupados de acordo com a sua origem de replicação usando o método baseado em PCR de *Replicon Typing*, descrito por Carattoli *et al*, 2005 [53]. Para a reacção de PCR foi usada a Supreme NZYtaq 2x Green Master Mix (NZYtech, Lda). As condições de electroforese usadas foram semelhantes às descritas para *fosA*.

Tabela I. Primers e programas específicos usados para cada gene

Gene	Primers	Desnaturaçã o inicial	Ciclos	Nº de Ciclos	Extensão final	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Fw: 5'-ATGGTTAAAAAATCACTGCGYC-3' Rev: 5'-TTACAAACCGTCGGTG-3'	94°C, 3 min	94°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C, 2 min	35	72°C, 7 min	[54]
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Fw: 5'-ATGATGACTCAGAGCATTTCGCC-3' Rev: 5'-TTACAAACCGTCGGTG-3'	94°C, 3 min	94°C, 1 min 61°C, 1 min 72°C, 2 min	30	72°C, 10 min	[51]
<i>bla</i> _{TEM}	Fw: 5'-CACTCAAGGATGTATTGTG-3' Rev: 5'- GGTGCCTCATGATTAAGCATTGGTAA-3'	95°C, 3 min	94°C, 1 min 30 s 56,5°C, 1 min 30 s 70°C, 1 min 30 s	35	70°C, 9 min	[55]
<i>bla</i> _{SHV}	Fw: 5'-CACTCAAGGATGTATTGTG-3' Rev: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'	96°C, 30 s	96°C, 30 s 50°C, 15 s 72°C, 2 min	45	72°C, 8 min	[56]
<i>bla</i> _{CMY}	Fw: 5'-ATGATGAAAAAATCGTTATGC-3' Rev: 5'- TTGTAGCTTTTCAAGAATGCG-3'	94°C, 5 min	94°C, 30 s 50°C, 30 s 72°C, 1 min	30	72°C, 10 min	[57]
<i>bla</i> _{DHA}	Fw: 5'-CTGATGAAAAAATCGTTATC-3' Rev: 5'- TTATTCCAGTGCACTCAAATA-3'	94°C, 3 min	94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C, 1 min	35	72°C, 7 min	[58]
<i>bla</i> _{AmpC}	Fw: 5'-TTCCTGATGATCGTTCTGCC-3' Rev: 5'-AAAAGCGGAGAAAAGGTCCG-3'	94°C, 4 min	94°C, 1 min 50°C, 1 min 72°C, 2 min	30	72°C, 10 min	[59]
<i>bla</i> _{OXA-2}	Fw: 5'-ATGGCAATCCGAATCTTCGC-3' Rev: 5'-TTATCGCGCWGCGTCCGAGTTGA-3'	94°C, 5 min	94°C, 1 min 30 s 60,5°C, 1 min 72°C, 2 min	37	72°C, 10 min	Criados no laboratório
<i>bla</i> _{OXA-10}	Fw: 5'-TATCGCGTGTCTTTCGAGTA-3' Rev: 5'-TTAGCCACCAATGATGCCC-3'	94°C, 3 min	94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C, 2 min	30	72°C, 8 min	[60]
<i>bla</i> _{OXA-24}	Fw: 5'-GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3' Rev: 5'-TTCCCCTAACATGAATTTGT-3'	94°C, 3 min	94°C, 1 min 50°C, 1 min 72°C, 2 min	30	72°C, 8 min	[61]

Gene	Primers	Desnaturaçã o inicial	Ciclos	Nº de Ciclos	Extensão final	Referência
<i>bla</i> _{OXA-58}	Fw: 5'-GGCTTGTGCTGAGCATAGTATG-3' Rev: 5'-CGTAGAGCAATATCATCACCAGC-3'	94°C, 6 min	94°C, 1 min 60,5°C, 1 min 72°C, 1 min	35	72°C, 5 min	Criados no laboratório
<i>qnrA</i>	Fw: 5'-GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG-3' Rev: 5'-GATCGGCAAAGGTCAGGTCA-3'	94°C, 45 s	94°C, 45 s 53°C, 45 s 72°C, 60s	33	72°C, 60 s	Criados no laboratório
<i>qnrB</i>	Fw: 5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3' Rev: 5'-CGATGCCTGGTAGTTGTCC-3'	94°C, 45 s	94°C, 45 s 53°C, 45 s 72°C, 60s	33	72°C, 60 s	Criados no laboratório
<i>qnrS</i>	Fw: 5'-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3' Rev: 5'-TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'	94°C, 45 s	94°C, 45 s 53°C, 45 s 72°C, 60s	33	72°C, 60 s	Criados no laboratório
Integrão de classe I	Fw: 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' Rev: 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	94°C, 5 min	94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C, 5 min	35	72°C, 10 min	[62]
Integrão de classe III	Fw: 5'-AGTGGGTGGCGAATGAGTG-3' Rev: 5'-TGTTCTTGTATCGGCAGGTG-3'	94°C, 5 min	94°C, 1 min 57°C, 20 s 72°C, 45 s	35	72°C, 4 min	[63]

3. Resultados e Discussão

3.1 Amostras

Entre 533 isolados bacterianos estudados, *Escherichia coli* foi o agente predominante (82,33%, n=438), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (6,77%, n=36) e *Proteus mirabilis* (3,20%, n=17) (Tabela II). As tendências mundiais apontam para prevalências de *E. coli* em infecções urinárias que variam entre 75 e 95% [64], estando este estudo de acordo com esses dados.

Tabela II. Bactérias uropatogénicas de Gram negativo isoladas de 533 urinas provenientes mulheres com cistites não complicadas

Microrganismo	Nº de isolados (Porcentagem)
<i>Escherichia coli</i>	438 (82,33%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	36 (6,77%)
<i>Proteus mirabilis</i>	17 (3,20%)
<i>Klebsiella</i> spp.	13 (2,44%)
<i>Proteus</i> spp.	7 (1,32%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4 (0,75%)
<i>Citrobacter koseri</i>	3 (0,56%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (0,56%)
<i>Citrobacter freundii</i>	2 (0,38%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (0,38%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2 (0,38%)
<i>Enterobacter</i> spp.	1 (0,19%)
<i>Morganella morganii</i>	1 (0,19%)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (0,19%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (0,19%)
<i>Providencia stuartii</i>	1 (0,19%)

3.2 Estudo da susceptibilidade aos antibióticos

- (i) Perfil de susceptibilidade em 533 isolados

O resultado do estudo inicial da susceptibilidade aos antibióticos nas 533 bactérias está representado na Figura 5. Foram escolhidos para este estudo inicial antibióticos geralmente usados na terapêutica da ITU.

Neste grupo, verificou-se um maior número de bactérias resistentes à amoxicilina (46,15%, n=246), à combinação trimetoprim/sulfametoxazole (25,89%, n=138) e à ciprofloxacina (15,76%, n=84), e um menor número de resistentes à fosfomicina (4,13%, n=22) e à cefuroxima (3,19%, n=17).

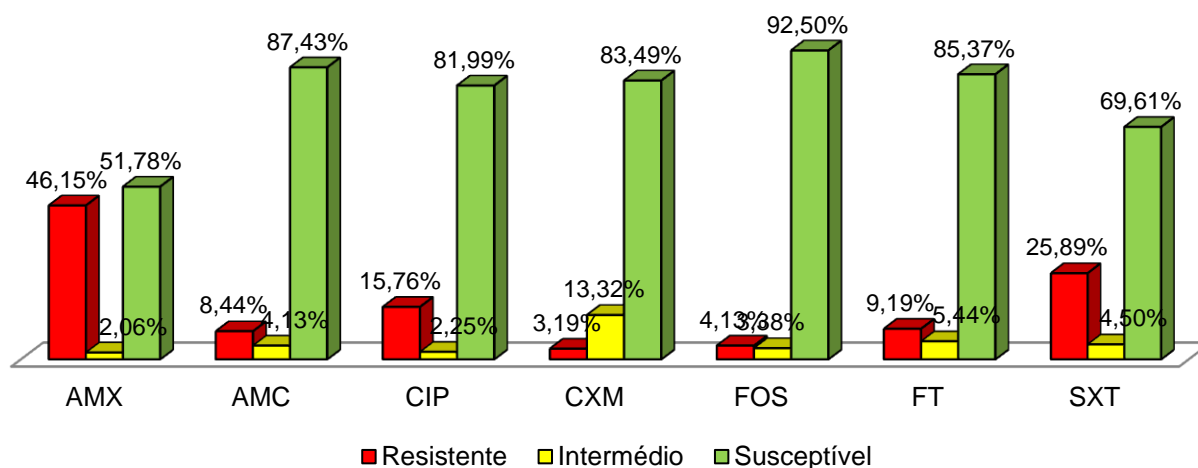


Figura 5. Perfil de susceptibilidade de 533 microrganismos aos antibióticos estudados. AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; AMX – amoxicilina; CIP – ciprofloxacina; CXM – cefuroxima; FOS – fosfomicina; FT – nitrofurantoína; SXT – trimetoprim/sulfametoxazole.

A resistência aos antibióticos de primeira linha no tratamento de infecções do tracto urinário tem aumentado nos últimos anos, limitando as escolhas terapêuticas. O aumento da resistência as fluoroquinolonas está associado a uma resistência cruzada a outras classes de antibióticos, nomeadamente β -lactâmicos e a associação trimetoprim/sulfametoxazole. Segundo o *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* [65] a Europa possui taxas de *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas entre 6% na Islândia e 52% na Turquia (Portugal com 29%). No entanto, o estudo ECO-SENS [5], que se refere apenas a *E. coli* responsável por infecções urinárias não complicadas, reporta taxas de resistência que variam entre 0 e 14,7% (Portugal com 5,8%). Tendo em conta que *E. coli* é o principal agente responsável por infecções do tracto urinário, quer na comunidade, quer no hospital, e que neste trabalho, a resistência à ciprofloxacina é superior a 15%, é reforçada a necessidade de reavaliação do uso de fluoroquinolonas no tratamento da ITU. Por outro lado, as *guidelines* da *European Association of Urology* (EAU) [66], assim como a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) [2,67] desaconselham o uso empírico de trimetoprim/sulfametoxazole em áreas em que a resistência exceda 20%. A frequência superior a 25% de isolados resistentes neste estudo põe em causa a utilização deste antibiótico no tratamento empírico de primeira linha de infecções urinárias na comunidade portuguesa.

Uma das alternativas propostas por estas associações, perante o panorama do aumento das resistências ao trimetoprim/sulfametoxazole e à ciprofloxacina (antibióticos previamente considerados de primeira linha no tratamento destas infecções), é a nitrofurantoína. Obteve-se uma taxa de isolados resistentes a este antibiótico perto de 10%, incluindo porém todos os géneros microbianos encontrados, nomeadamente *Proteus* spp. que é naturalmente resistente a este antibiótico. Se contabilizarmos a resistência apenas nos isolados de *E. coli*, este valor desce para os 3,42% (15 em 438). No entanto, este antibiótico está associado a menor taxas de cura e mais efeitos secundários que os referidos anteriormente [2].

Quanto à amoxicilina/ácido clavulânico, a sua prescrição deve ser cautelosa pois a resistência a este antimicrobiano tem vindo a aumentar nos últimos anos, e neste estudo, 8,44% (n=45) dos isolados apresentam resistência o que pode indicar uma probabilidade de aumentar o número de bactérias resistentes.

Neste estudo a resistência à fosfomicina foi de 4,13%, ao contrário de vários estudos europeus, que apontam para resistências entre 0 e 2,5% [68,69]. Este é no entanto um grupo heterogéneo de bactérias. Se for considerado apenas a resistência nos 438 isolados de *E. coli*, este valor diminui para 2,05%, o que é concordante com os estudos referidos. Por outro lado, se for contabilizada a resistência apenas dentro do grupo *Klebsiella* (n=51), o valor é de 17,65% (n=9), o que ajuda a explicar a resistência mais elevada no grupo heterogéneo.

(ii) Selecção de isolados com susceptibilidade diminuída à fosfomicina

Bactérias com halo de inibição à fosfomicina inferior a 20 milímetros (n=83, 15,60% do total) foram seleccionadas para a caracterização da susceptibilidade à fosfomicina e a outras classes de antibióticos: do grupo dos β -lactâmicos, como monobactams (aztreonam), cefalosporinas de 2^a (cefoxitina), 3^a (ceftazidima e cefotaxima) e 4^a (cefepima) geração e carbapenems (imipenem), do grupo das quinolonas (levofloxacina), do grupo dos aminoglicosídeos (gentamicina), assim como novos antibióticos introduzidos na terapêutica de infecções por microrganismos multirresistentes (tigeciclina e colistina).

A distribuição de espécies bacterianas neste grupo de 83 bactérias está representada na Tabela III. Neste grupo escolhido pela susceptibilidade diminuída à fosfomicina, ao contrário do grupo inicial de 533 isolados, *Klebsiella pneumoniae* foi o microrganismo mais representado (n=32, 38,55%).

Tabela III. Espécies bacterianas seleccionadas com halo inferior a 20 mm à fosfomicina

Microrganismo	Nº de isolados (Percentagem em 83 isolados)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32 (38,55%)
<i>E. coli</i>	21 (25,30%)
<i>Klebsiella</i> spp.	12 (14,46%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3 (3,61%)
<i>Proteus mirabilis</i>	3 (3,61%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (2,41%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2 (2,41%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (2,41%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (1,20%)
<i>Enterobacter</i> spp.	1 (1,20%)
<i>Morganella morganii</i>	1 (1,20%)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (1,20%)
<i>Proteus</i> spp.	1 (1,20%)
<i>Providencia stuartii</i>	1 (1,20%)

Na Figura 6 está representado o perfil de susceptibilidade dos 83 isolados. A resistência verificada ao grupo dos β -lactâmicos variou entre 1,2% (n=1) para o imipenemo e 8,43% (n=7) para as cefalosporinas de segunda e terceira geração. A resistência no grupo das quinolonas foi idêntica para os dois antibióticos testados (n=12, 14,46%) o que aponta para o facto de a resistência a estes antibióticos ocorrer em simultâneo.

A resistência à tigeciclina neste grupo de 83 isolados foi de 14,46% (n=12) e à colistina de 10,84% (n=9), o que é um número preocupante, tendo em conta que estes são considerados antibióticos de última linha no tratamento de infecções por microrganismos multirresistentes. Este número está relacionado com este ser um grupo contendo vários géneros bacterianos, nomeadamente *Proteus*, que é naturalmente resistente à colistina [70].

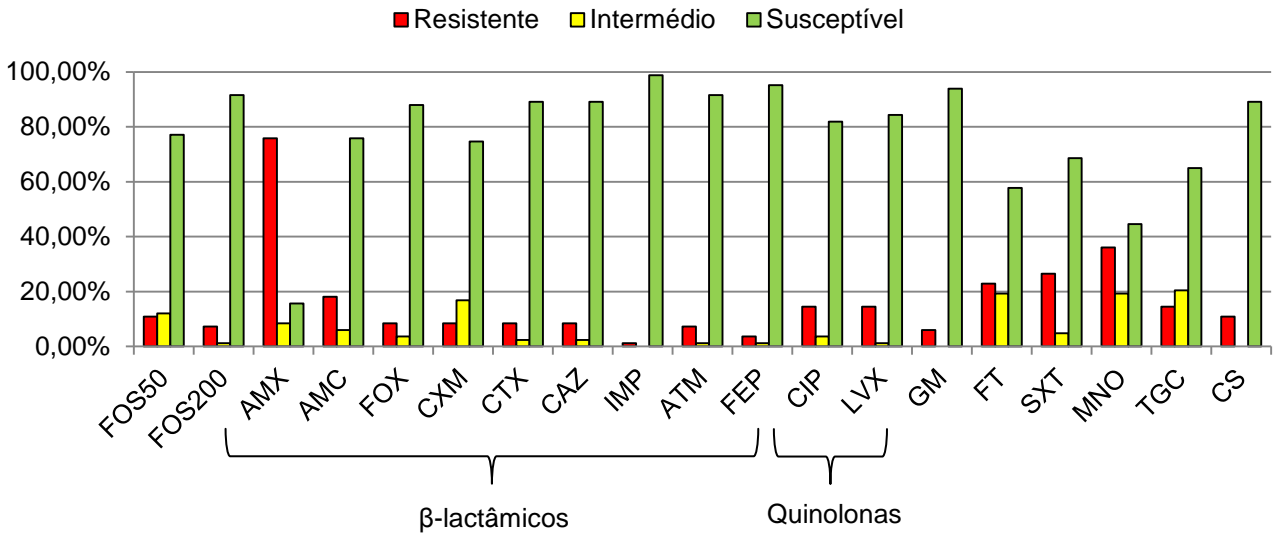


Figura 6. Perfil de susceptibilidade de 83 isolados aos antibióticos estudados. FOS50 – fosfomicina 50µ g; FOS200 – fosfomicina 200 µg; AMX – amoxicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; FOX – ceftazidima; CXM – cefuroxima; CTX – cefotaxima; CAZ – ceftazidima; IMP – imipenemo; ATM – aztreonamo; FEP – cefepima; CIP – ciprofloxacina; LVX – levofloxacina; GM – gentamicina; FT – nitrofurantoína; SXT – trimetoprim/sulfametoxazole; MNO – minociclina; TGC – tigeciclina; CS – colistina.

A resistência à fosfomicina foi de 10,84% (n=9), quando usando o disco com carga de 50 µg e 7,23% (n=6) usando o disco de 200 µg. A fosfomicina é um antibiótico que tem duas formulações possíveis: intravenosa (fosfomicina disódica) e oral (fosfomicina trometamol). O facto de existirem duas cargas em disco (50 µg e 200 µg) para testar a susceptibilidade de fosfomicina está relacionado com as duas formulações possíveis e as suas propriedades particulares, que estão descritas na página 6 da introdução. O disco que contém 200 µg de fosfomicina é o recomendado pelo CLSI para testar microrganismos responsáveis por ITU, pois a formulação mais correcta para o seu tratamento é a fosfomicina trometamol. Inicialmente no grupo de 533 bactérias foi usada uma carga de 50 µg de modo a dar seguimento a outros trabalhos paralelos no laboratório. Nesta fase do estudo, tendo o objectivo de estudar a fosfomicina no tratamento de infecções urinárias, foi introduzido o disco de 200 µg. Com o disco de 200 µg obteve-se um menor número de resistentes, o que pode estar relacionado com estas serem de facto bactérias uropatogénicas e a concentração de 50 µg poder ser sub-inibitória.

Por outro lado, nesta fase, e tendo em conta as recomendações do CLSI para o estudo da susceptibilidade este antibiótico, foi adicionado ao meio de Müller-Hinton 25 µg/mL de glucose-6-fosfato [32]. Este procedimento permitiu eliminar mutantes cromossomais que surgiram no antibiograma inicial, manifestando-se através de colónias dentro do halo, que poderão ter levado a uma falsa interpretação do antibiograma. A diferença de resultados pode ser observada na Figura 7. Esta alteração ajuda a explicar que apenas 6 bactérias, usando o

disco de 50 µg e 9, usando o disco de 200 µg, se provaram resistentes em vez das 22 inicialmente resistentes à fosfomicina presentes nesta selecção de 83.

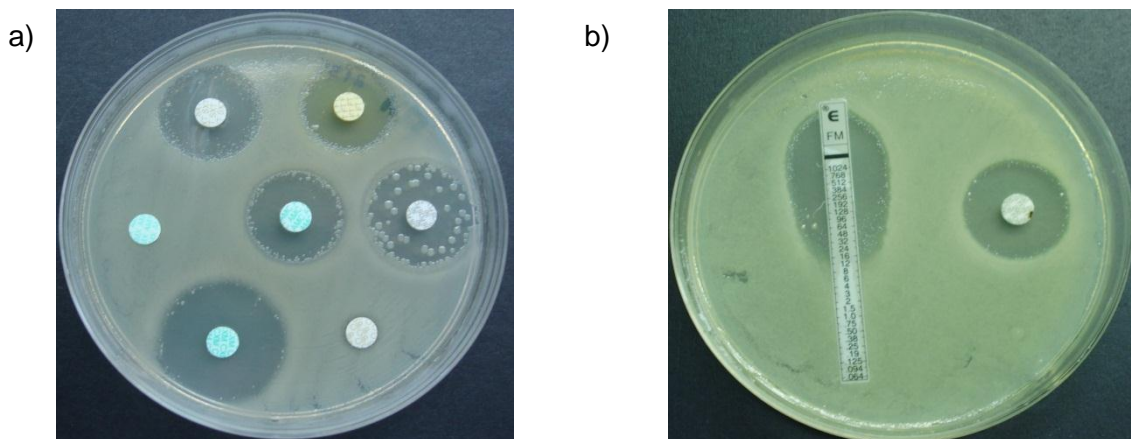


Figura 7. a) Exemplo de antibiograma inicial de *E. coli* sem adição de glucose-6-fosfato. b) Exemplo de determinação de CMI da fosfomicina por E- test para o isolado 201-076 (*K. pneumoniae*), adicionando 25 µg/mL de glucose-6-fosfato ao meio, com disco de FOS 200 µg.

Dos 83 isolados foram escolhidos 23 com base em dois critérios: possuem resistência ou susceptibilidade intermédia à fosfomicina ou possuem um perfil de multirresistência aos antibióticos.

Foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) de fosfomicina neste grupo através do método E-test, estando os resultados representados na Tabela IV. Nesta tabela, considerou-se resistência à fosfomicina pelo método de difusão em disco apenas usando a carga de 200 µg.

Um dos problemas com a avaliação da susceptibilidade à fosfomicina é a falta de *breakpoints* estandardizados. O CLSI apenas recomenda *breakpoints* para *E. coli* e *Enterococcus faecalis*, não recomendando o uso deste antibiótico para além de infecções urinárias não complicadas causadas por estes microrganismos. Neste estudo, estes *breakpoints* foram generalizadas para o resto das bactérias.

De acordo com os *breakpoints* descritos pelo CLSI (Tabela V), verificou-se uma correlação entre o método de difusão em disco e a determinação de CMI por E-test, sendo que os 5 isolados com CMI superior a 1024 µg/mL também são pelo outro método. O isolado 203-131 é resistente à fosfomicina por método de difusão, mas possui uma CMI de 64 µg/mL.

Tabela IV. 23 microrganismos selecionados, perfil de resistência aos antibióticos obtidos pelo meio de difusão de disco em meio Müller-Hinton, usando os *breakpoints* do CLSI, e CMI de fosfomicina correspondente.

Nº isolado	Microrganismo	Perfil de Resistência	CMI Fosfomicina (µg/mL)
228-043	<i>K. pneumoniae</i>	Fos	>1024
201-075	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Fos	>1024
208-309	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Ft	2
225-051	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Sxt	1
228-084	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Tgc Ft Sxt	12
201-188	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Cxm Ctx Caz Atm Fep Cip Lvx Mno	48
228-085	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Atm Cip Mno Sxt	2
212-193	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Cxm Ctx Atm Cip Lvx	2
201-076	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Caz Cip Lvx Sxt Gm	12
206-086	<i>E. coli</i>	Amx Cxm Ctx Caz Atm Fep Cip Lvx Gm	48
203-131	<i>E. coli</i>	Amx Amc Mno Tgc Ft Cs Fos	64
201-159	<i>E. coli</i>	Amx Amc Cip Lvx Mno Sxt Cs	64
225-010	<i>E. cloacae</i>	Amx Amc Fox Cxm Caz Atm Cip Lvx Mno Sxt Gm	24
212-001	<i>E. cloacae</i>	Fox Mno	4
209-088	<i>E. aerogenes</i>	Amx Amc Fox	16
209-027	<i>P. mirabilis</i>	Mno Ft Sxt Cs Fos	>1024
206-020	<i>P. mirabilis</i>	Cip Mno Sxt Cs	12
201-047	<i>P. mirabilis</i>	Cip Lvx Mno Ft Sxt Cs	2
201-056	<i>M. morgani</i>	Amx Amc Fos	>1024
201-094	<i>P. stuartii</i>	Amx Amc Mno Ft Sxt Cs	192
203-076	<i>P. aeruginosa</i>	Amx Amc Fox Cxm Mno Tgc Ft Sxt Fos	>1024
206-055	<i>P. aeruginosa</i>	Amx Amc Mno Cs	64
204-020	<i>A. baumannii</i>	Amx Amc Fox Cxm Ctx Caz Imp Atm Fep Cip Lvx Mno Gm Ft Sxt	96

Nota: Fos – fosfomicina; Amx – amoxicilina; Amc – amoxicilina/ácido clavulânico; Fox – cefoxitina; Cxm – cefuroxima; Ctx – cefotaxima; Caz – ceftazidima; Imp – imipenemo; Atm – aztreonamo; Fep – cefepima; Cip – ciprofloxacina; Lvx – levofloxacina; Gm – gentamicina; Ft – nitrofurantoína; Sxt – trimetoprim/sulfametoxazole; Mno – minociclina; Tgc – tigeciclina; Cs – colistina.

No entanto, várias outras entidades, como o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e a *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC), apesar de referirem critérios de susceptibilidade apenas para *E. coli*, sugerem que o *breakpoint* de resistência deve ser 32 µg/mL, um valor muito inferior ao do CLSI (Tabela V). Se forem usados

os critérios EUCAST, o número de bactérias resistentes neste grupo de 23 sobe de 5 para 12 (Tabela IV), incluindo-se os isolados com CMIs entre 48 e 192 µg/mL.

Tabela V. Critérios de susceptibilidade à fosfomicina no tratamento de ITU, de acordo com diferentes guidelines internacionais

Guidelines	Breakpoints			Diâmetro de halo de inibição (mm)			Notas
	CMIs (µg/mL)						
	R	I	S	R	I	S	
CLSI [32]	≥256	128	≤64	≤12	13-15	≥16	Apenas para <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i>
EUCAST [49]	>32	-	≤32	-	-	-	Sem indicações
BSAC [50]	>32	-	≤32	≤24	-	≥25	Apenas para <i>E. coli</i> e, no caso de <i>P. mirabilis</i> , R se halo inferior a 37 mm

Nota: R – Resistente, I – Intermédio, S- Sensível

O facto de haver discrepâncias entre os diferentes *breakpoints*, de não haver critérios aprovados para bactérias além de *E. coli* e *E. faecalis*, em conjunto com a dificuldade de avaliação da resistência, devido às mutações espontâneas *in vitro*, é uma das grandes desvantagens deste antibiótico. Vários autores desaconselham o uso do método E-test para determinação de CMIs e outros o método de difusão em disco, mas parecem concordar que o método mais correcto varia consoante a espécie em estudo [71,72,73].

Como é possível verificar pela Tabela IV, apesar do grupo final ser um grupo heterogéneo, 9 dos 23 isolados são de *K. pneumoniae*. *E. coli* representou apenas 3 dos 23 isolados, apesar de, no total, representar mais de 80% dos 533 isolados iniciais, o que se justifica pela diminuída resistência à fosfomicina nesta espécie. Mesmo os 3 isolados aqui incluídos, sendo os menos susceptíveis, apenas atingem CMI de 64 µg/mL.

Apesar de a maioria destes isolados apresentar um perfil de multirresistência, não existe um perfil predominante, sendo cada isolado resistente a diferentes combinações de antibióticos.

3.3 Caracterização fenotípica da resistência à fosfomicina – utilização de fontes de carbono

Tal como foi referido na introdução, o transporte da fosfomicina para o citoplasma, onde exerce a sua actividade antimicrobiana, dá-se por dois possíveis transportadores: GlpT (transportador de G3P) ou UhpT (transportador de G6P). Sabendo isto, possíveis mutações nos 2 transportadores da fosfomicina foram detectadas usando meios selectivos contendo como fonte única de carbono os substratos dos transportadores. Foi utilizada uma técnica descrita

por Takahata *et al*, 2010 [28]. Estes autores apenas estudaram isolados de *E. coli*, e neste estudo esta técnica foi aplicada a todos os géneros incluídos no grupo final de 23 isolados, visto não haver nenhum estudo semelhante para espécies além de *E. coli*.

Na Figura 9 estão representadas as placas de meios selectivos. As suspensões bacterianas foram colocadas usando um aparelho Stiers.

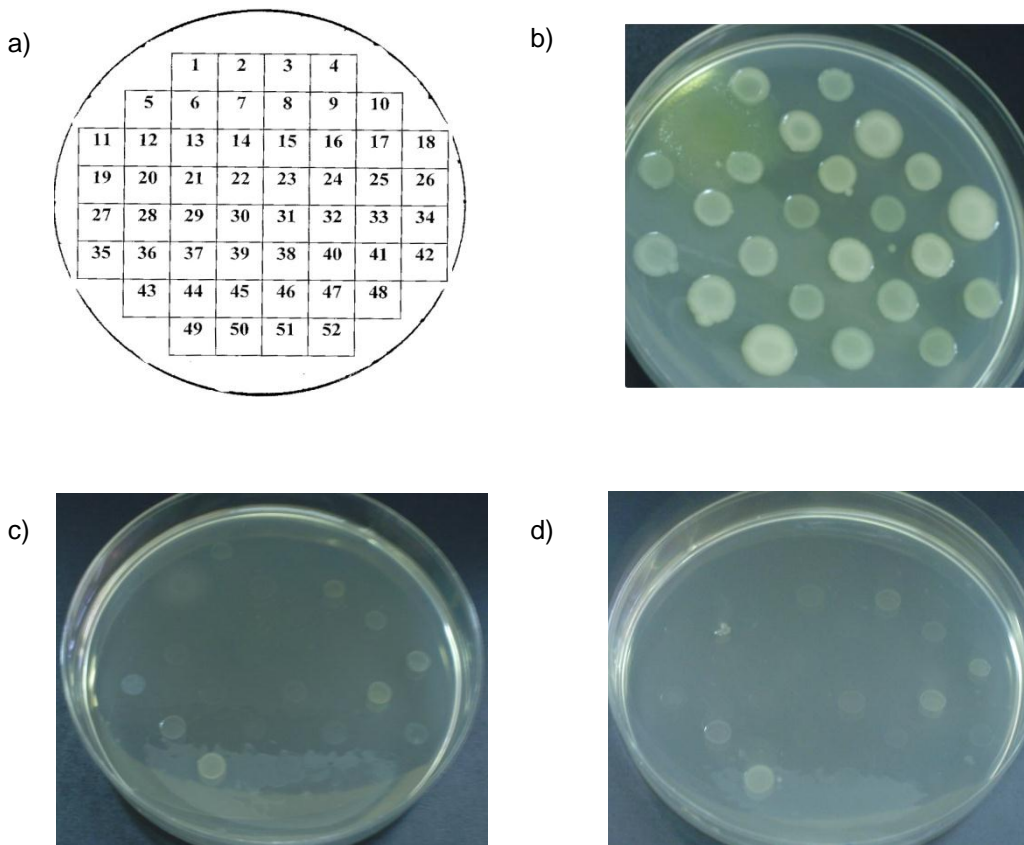


Figura 8. Utilização de fontes de carbono. a) esquema de aplicação do Stiers; b) controlo positivo em meio de PCA; c) meio M9 suplementado com G3P; d) meio M9 suplementado com G6P. Colocação das suspensões: 1. 228-043; 3. 201-056; 5. 203-076; 7. 201-075; 9. 208-309; 11. 209-027; 13. 203-131; 15. 201-094; 17. 225-051; 20. 206-086; 22. 206-020; 24. 206-055; 26. 228-084; 27. 225-010; 29. 201-188; 31. 209-088; 33. 228-085; 36. 212-193; 38. 201-159; 40. 212-001; 42. 201-076; 44. 204-020; 46. 201-047.

Os resultados obtidos para cada isolado podem ser consultados na Tabela VI. A ausência de crescimento nestes meios pode implicar perda de funcionalidade dos transportadores o que resulta na resistência à fosfomicina. O facto de esta resistência ser descrita como acontecendo mais frequentemente deve-se ao facto de ser cromossomal e ter vários genes alvo possíveis, tal como já foi descrito na introdução.

Neste estudo, seis isolados não cresceram na presença de glicerol-3-fosfato (G3P) (26,09%), três não cresceram na presença de glucose-6-fosfato (G6P) (13,04%) e cinco não cresceram

em ambos (21,74%), o que significa que 60,87% dos 23 isolados tem alguma mutação que impede a entrada de fosfomicina no meio intracelular. *P. aeruginosa* não possui o transportador específico da glucose-6-fosfato, UhpT [26], pelo que não cresce em meio com G6P.

Tabela VI. Resultados referentes ao estudo da resistência à fosfomicina

Nº isolado	Microrganismo	CMI Fosfomicina (µg/mL)	M9 + G3P	M9 + G6P	<i>fosA</i>
228-043	<i>K. pneumoniae</i>	>1024	+	-	+
201-075	<i>K. pneumoniae</i>	>1024	-	+	+
208-309	<i>K. pneumoniae</i>	2	+	+	+
225-051	<i>K. pneumoniae</i>	1	+	+	+
228-084	<i>K. pneumoniae</i>	12	+	+	+
201-188	<i>K. pneumoniae</i>	48	-	+	-
228-085	<i>K. pneumoniae</i>	2	+	+	+
212-193	<i>K. pneumoniae</i>	2	+	+	+
201-076	<i>K. pneumoniae</i>	12	+	-	+
206-086	<i>E. coli</i>	48	-	+	-
203-131	<i>E. coli</i>	64	-	-	-
201-159	<i>E. coli</i>	64	-	+	-
225-010	<i>E. cloacae</i>	24	-	+	<i>fosA</i> ^{1N}
212-001	<i>E. cloacae</i>	4	+	-	-
209-088	<i>E. aerogenes</i>	16	+	+	+
209-027	<i>P. mirabilis</i>	>1024	-	-	-
206-020	<i>P. mirabilis</i>	12	-	-	-
201-047	<i>P. mirabilis</i>	2	+	-	-
203-076	<i>P. aeruginosa</i>	>1024	+	NA	-
206-055	<i>P. aeruginosa</i>	64	-	NA	-
201-056	<i>M. morgani</i>	>1024	-	-	-
201-094	<i>P. stuartii</i>	192	-	-	-
204-020	<i>A. baumannii</i>	96	+	+	-

Crescimento fraco sem formação de colónias após 48h foi considerado negativo

M9: Meio minimal salts agar

G3P: glicerol-3-fosfato

G6P: glucose-6-fosfato

Para M9 + G3P e M9 + G6P, + representa crescimento e - não crescimento

NA: Não aplicável

O não crescimento nestes meios demonstra incapacidade de utilizar estes açúcares, o que poderá estar relacionado com a incapacidade de transportar estes açúcares para o citoplasma bacteriano. Mutações que afectam o transporte destes açúcares afectam também o transporte da fosfomicina visto utilizarem a mesma via de entrada. Nos isolados de *K. pneumoniae*, que estão mais representados neste grupo, é possível verificar que o não crescimento nestes meios

selectivos resultam de facto num aumento de CMI quando comparados com isolados em que não houve crescimento, o que aponta para alterações ao nível do transporte que afectam a susceptibilidade à fosfomicina.

3.4 Caracterização molecular – Detecção de *fosA*, perfis genómicos e resistência associada a outros antibióticos

O gene *fosA* foi detectado em oito isolados de *K. pneumoniae* e em um isolado de *E. aerogenes*. Foi ainda detectada a presença da variante *fosA^{TN}*, ou seja, a variante associada ao transposão Tn2921 de *Serratia marcescens* no isolado 225-010 *E. cloacae*. Os resultados obtidos estão representados na Tabela VII.

As sequências aminoacídicas obtidas após sequenciação do gene *fosA* revelaram homologias com o gene identificado num plasmídeo de *K. pneumoniae* (nº de acesso NC_011617), no caso dos isolados de *K. pneumoniae* que variaram entre 89 e 98%. Já o isolado de *E. aerogenes* possuía uma homologia aminoacídica com este gene de 92%. No caso do isolado de *E. cloacae*, este possuía uma homologia com a proteína de *K. pneumoniae* de 69%, mas uma homologia com o gene do transposão Tn2921 (nº de acesso FJ829469) de 96% (Tabela VII).

Tabela VII. Homologia de FosA de cada isolado com a sequência aminoacídica de *K. pneumoniae* e do transposão Tn2921

Nº isolado	Microrganismo	Homologia com FosA de <i>K. pneumoniae</i> (NC_011617)	Homologia com FosA de Tn2921 (FJ829469)
228-043	<i>K. pneumoniae</i>	96%	70%
201-075	<i>K. pneumoniae</i>	89%	67%
208-309	<i>K. pneumoniae</i>	94%	68%
225-051	<i>K. pneumoniae</i>	97%	70%
228-084	<i>K. pneumoniae</i>	98%	71%
228-085	<i>K. pneumoniae</i>	98%	71%
212-193	<i>K. pneumoniae</i>	96%	70%
201-076	<i>K. pneumoniae</i>	96%	70%
225-010	<i>E. cloacae</i>	92%	71%
209-088	<i>E. aerogenes</i>	69%	96%

Existem vários aminoácidos que estão descritos como importantes na actividade enzimática de FosA, Os aminoácidos His⁷, His⁶⁷ e Glu¹¹³ estão associados à ligação ao catião Mn²⁺, essencial para a actividade catalítica de FosA; Tyr³⁹, Trp⁴⁶ e Cys⁴⁸ estão associados à ligação com a

glutathione e por fim Thr⁹ foi proposto como interagindo com a fosfomicina, actuando como dador de prótons e facilitando a abertura do anel epóxido da fosfomicina, sendo que mutações neste aminoácido reduzem significativamente a actividade catalítica da fosfomicina [74,75,76].

Apesar de as homologias aminoacídicas às sequências originais de FosA e FosA^{TN} não atingirem os 100%, todos os aminoácidos referidos, cujas funções são essenciais na actividade catalítica desta enzima, permanecem conservados nas sequências obtidas a partir dos isolados positivos.

Tipificação molecular

Para determinar a relação entre cada isolado e verificar se existe algum clone em comum, foi aplicada a técnica de ERIC-PCR para determinação de perfis genómicos. Esta determinação era particularmente importante no que diz respeito *K. pneumoniae*, pois foram estudados nove isolados deste microrganismo, oito dos quais possuía *fosA*, de modo a verificar se estaríamos presentes num só clone.

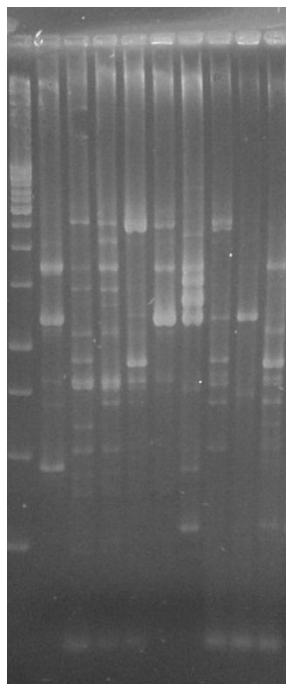


Figura 9. Perfis electroforéticos obtidos por ERIC-PCR dos 9 isolados de *K. pneumoniae* incluídos no estudo final

Esta técnica revelou que, mesmo dentro da mesma espécie bacteriana, não há um perfil predominante, sendo que cada isolado teve um perfil particular. Este resultado é de esperar,

tendo em conta que este estudo apenas engloba isolados da comunidade e que as urinas foram obtidas em laboratórios situados em diferentes regiões do país. Na Figura 8 estão representados os perfis heterogêneos obtidos para os isolados de *K. pneumoniae*.

O facto de os perfis bacterianos serem diferentes nos isolados de *K. pneumoniae*, demonstra que o gene *fosA* não está associado a um determinado clone desta espécie, mas que se disseminará por transmissão horizontal entre diferentes clones.

Resistência associada a outras classes de antibióticos

Um dos objectivos deste trabalho era estudar a resistência a outros antibióticos associada à fosfomicina. Na Tabela VII estão representados os genes de resistência e os grupos de incompatibilidade plasmídica detectados nos isolados que possuíam o gene *fosA*.

No grupo que possuía o gene *fosA*, além do perfil genómico por ERIC-PCR ser diferente, também os perfis de resistência aos antibióticos foram distintos, pelo que seria de esperar diferentes perfis enzimáticos de resistência.

Tabela VIII. Perfil de resistência, enzimas associadas e plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade presentes em cada isolado que possui o gene *fosA*.

Nº isolado	Microrganismo	Perfil de Resistência	Mecanismos de Resistência	Grupo de Incompatibilidade de plasmídeos
228-043	<i>K. pneumoniae</i>	Fos	-	FIA, FIIAs, T
201-075	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Fos	SHV-11	FIA, X, Y
208-309	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Ft	SHV-33	FIA, Y
225-051	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Sxt	-	FIA, X, T, FIIAs, K, FIC
228-084	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Tgc Ft Sxt	TEM-1	X
228-085	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Atm Cip Mno Sxt	-	FIA
212-193	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Cxm Ctx Atm Cip Lvx	CTX-M-15, TEM-1 TEM-24, Integração de	-
201-076	<i>K. pneumoniae</i>	Amx Caz Cip Lvx Sxt Gm	classe I contendo gene <i>aacA4</i>	X, A/C
225-010	<i>E. cloacae</i>	Amx Amc Fox Cxm Caz Atm Cip Lvx Mno Sxt Gm	SHV-12, DHA-1, QnrB4	HI1, I1-Iy
209-088	<i>E. aerogenes</i>	Amx Amc Fox	-	K

Nota: Fos – fosfomicina; Amx – amoxicilina; Amc – amoxicilina/ácido clavulânico; Fox – cefoxitina; Cxm – cefuroxima; Ctx – cefotaxima; Caz – ceftazidima; Atm – aztreonamo; Cip – ciprofloxacina; Lvx – levofloxacina; Gm – gentamicina; Ft – nitrofurantoína; Sxt – trimetoprim/sulfametoxazole; Mno – minociclina; Tgc – tigeciclina.

A enzima CTX-M-15 foi detectada em um isolado. Esta β -lactamase de espectro alargado está associada à resistência elevada tanto à cefotaxima como à ceftazidima. O facto de estar normalmente contida em plasmídeos com vários genes de resistência resulta num fenótipo de resistência não só às cefalosporinas de terceira geração e monobactams, como também às quinolonas e aminoglicosídeos [77]. Este isolado demonstrou multirresistência, o que está de acordo com este facto.

No que diz respeito a enzimas do tipo TEM, como se pode verificar na Tabela VIII, dois isolados possuem TEM-1 e um TEM-24. A TEM-1 é a β -lactamase mais encontrada nas bactérias de Gram negativo e cerca de 90% da resistência à ampicilina é conferida pela sua produção. Esta enzima hidrolisa penicilinas e as primeiras cefalosporinas, como a cefalotina ou a cefaloridina, mas não tem actividade significativa contra as cefalosporinas de largo espectro e é inibida pelo ácido clavulânico [9]. As bactérias que produzem apenas esta enzima são sensíveis às cefalosporinas de 2^a, 3^a e 4^a geração estudadas, mas apresentam resistência ou susceptibilidade intermédia à amoxicilina, devido à actividade da TEM-1. O isolado *K. pneumoniae* 201-076 codifica a TEM-24, uma ESBL essencialmente ceftazidimase, o que explica a resistência a este antibiótico, assim como uma diminuição da susceptibilidade à cefotaxima e ao aztreonam neste isolado. Esta enzima já foi anteriormente descrita em Portugal, associada a um plasmídeo com uma origem de replicação do grupo IncA/C [78]. 201-076 possui um plasmídeo pertencente a este grupo de incompatibilidade, pelo que é provável que o gene *bla*_{TEM-24} esteja presente neste plasmídeo.

Três enzimas do tipo SHV (-11, -12 e -33) foram encontradas. Estas enzimas são ceftazidimases, tendo maior afinidade para a ceftazidima do que para a cefotaxima. No entanto, apenas 225-010 *E. cloacae*, que produz SHV-12, apresenta resistência à ceftazidima e susceptibilidade intermédia à cefotaxima. Isto porque tanto a SHV-11 como a SHV-33 não são ESBLs, pelo que não hidrolisam cefalosporinas de largo espectro, mas são capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas iniciais, sendo responsáveis pela resistência à amoxicilina [79,80].

Um isolado possuía o gene que codifica para DHA-1, uma cefalosporinase plasmídica indutível do tipo AmpC resistente ao ácido clavulânico [58], resistente à combinação amoxicilina/ácido clavulânico, tal como se verifica em *E. cloacae* 225-010.

Em relação à resistência às quinolonas, foi apenas testada a presença de genes do tipo *qnr*, responsáveis pela diminuição da susceptibilidade, pois estes são genes plasmídicos que são disseminados por transferência horizontal. Foi estudado em todos os isolados os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, genes presentes em plasmídeos, mas apenas foi detectado o gene *qnrB4* no isolado 225-010, pelo que a resistência nos outros isolados deverá ocorrer por mutações cromossomais, nomeadamente nos genes *parC* (topoisomerase IV) ou *gyrA* (DNA girase), que codificam os alvos das quinolonas, ou por efluxo [17].

Um integrão de classe I foi detectado no isolado 201-076 de *K. pneumoniae*, possuindo o gene *aacA4*, que codifica para uma aciltransferase, responsável pela resistência aos aminoglicosídeos, que se manifesta pela resistência demonstrada à gentamicina.

Apesar de neste estudo o objectivo ser estudar a resistência associada à fosfomicina, o perfil enzimático foi estudado também nos restantes 13 dos 23 isolados, tendo sido confirmada a presença de duas enzimas do tipo CTX-M-15 (em *E. coli* e *K. pneumoniae*), uma DHA-1 (em *E. coli*), uma TEM-1 (em *P. mirabilis*), uma TEM-156 (em *P. stuartii*) e um integrão de classe I contendo os genes *aacA4* e *aadA1* (em *A. baumannii*).

Sendo este um grupo de bactérias heterogéneo obtido de urinas da comunidade, em laboratórios situados em diferentes zonas do país, aliado ao facto de todas estas bactérias apresentarem fenótipos de resistência distintos, assim como perfis electroforéticos de ERIC-PCR diversificados é de esperar que o perfil plasmídico seja variado. Como se pode verificar na Tabela VIII, não parece haver um plasmídeo predominante, apesar de 5 dos 7 isolados de *K. pneumoniae* com o gene *fosA* possuírem plasmídeos do grupo heterogéneo F, grupo assim denominado devido às suas origens de replicação possuírem regiões de homologia altamente conservadas [53]. Tendo em conta o perfil de enzimas distinto em cada isolado, e que estes apenas têm em comum o gene *fosA*, é possível que o plasmídeo com origem de replicação do grupo de incompatibilidade IncF seja responsável pela sua disseminação em isolados de *K. pneumoniae*. Inicialmente, este gene foi descrito como sendo codificado em plasmídeos do grupo IncL/M e IncC [36], mas entretanto já foi descrito como estando presente em vários plasmídeos diferentes.

E. cloacae possui plasmídeos com origens de replicação pertencentes a grupos de incompatibilidade que não foram detectados em mais nenhum isolado, o que está relacionado com o seu perfil de susceptibilidade aos antibióticos e às enzimas que produz. Por outro lado, este é o isolado que possui a variante do transposição Tn2921 do gene *fosA* o que aponta para a possibilidade de este gene poder ter sido transferido para o seu cromossoma.

O único isolado de *E. aerogenes* também possui um perfil plasmídico distinto, só tendo sido detectado o grupo de incompatibilidade IncK. Este plasmídeo poderá ser responsável pela transmissão de *fosA* nesta espécie bacteriana.

Para estudar a capacidade de transmitir horizontalmente este gene, seria necessário realizar estudos de transformação ou conjugação, de modo a estudar qual a sua capacidade de disseminação não só na mesma espécie mas em géneros diferentes. No entanto, realizar estas técnicas torna-se complexo pelo facto de não ser possível utilizar a fosfomicina como antibiótico de selecção de estirpes transformantes/transconjugantes, devido à elevada taxa de mutação *in vitro* na presença de pressão selectiva deste antibiótico, o que dá origem a mutantes cromossomais resistentes em vez de células receptoras possuindo o marcador plasmídico de resistência.

3.5 Relação entre a CMI da fosfomicina e os mecanismos de resistência

No caso dos isolados de *K. pneumoniae*, é de notar que os únicos com uma CMI superior a 1024 µg/mL possuem além de FosA, um défice no transporte de G6P (228-043) ou G3P (201-075). O transporte deficitário para o meio intracelular, junto com a presença de uma enzima que inibe a actividade de fosfomicina confere elevada resistência no caso destes dois isolados. O isolado 201-188, não possuindo o gene *fosA*, é o único com uma CMI de 48 µg/mL. Porém, este isolado possuía alterações no transporte de G3P, o que justifica a sua CMI elevada. Quanto às restantes bactérias desta espécie, apesarem de possuírem *fosA*, apresentaram CMIs reduzidas, sendo sensíveis, o que pode demonstrar que a presença deste gene, por si só, não confere resistência. No entanto, é necessário referir que os critérios usados são apenas recomendados para *E. coli* e alguns autores verificam resultados discrepantes consoante o método para determinação de CMI escolhido no caso de *Klebsiella pneumoniae*. Por outro lado, a presença deste gene, em conjunto com alteração de um dos transportadores parece dar origem a CMIs superiores, quando comparado com isolados em que apenas o transporte é afectado.

Isto também se verificou nos isolados do género *Enterobacter*, o outro género que neste estudo possui a glutatona transferase. O isolado 209-088 (*E. aerogenes*), que possui *fosA*, mas que cresce em ambos os meios estudados, tem uma CMI de 16 µg/mL, sendo sensível à fosfomicina. No caso do 225-010, que possui *fosA^{TN}* e alteração do transporte de G3P, a CMI é superior (24 µg/mL), sendo ainda sensível.

Os 3 isolados de *E. coli* devem a sua CMI, que varia entre 48 e 64 µg/mL, à alteração no transporte de G3P ou G3P e G6P em simultâneo. Este é o mecanismo de resistência descrito mais frequente em *E. coli* [33].

No que diz respeito aos outros géneros bacterianos incluídos nesta fase do estudo, os resultados não permitem tirar conclusões sobre os mecanismos de resistência à fosfomicina. A presença de alteração no transporte afecta de facto a CMI, mas o aumento varia de espécie para espécie e mesmo dentro da mesma espécie, não havendo relação específica com o mecanismo presente. Seriam necessários estudos com um maior número de isolados de cada espécie para poder estabelecer uma relação.

Em relação à diferença entre critérios de definição de susceptibilidade, os resultados obtidos neste estudo parecem indicar que o *breakpoint* recomendado pelo EUCAST para definição de resistência à fosfomicina (≥ 32 µg/mL) poderá ser mais adequado que os do CLSI, tendo em conta que houve um número de bactérias que, apesar de apresentar CMIs inferiores a 256 µg/mL, possui alterações ao nível do transporte que podem diminuir a actividade

antimicrobiana *in vivo* da fosfomicina. Este facto é particularmente visível nos isolados de *E. coli*.

As alterações relacionadas com o transporte da fosfomicina parecem ter uma relação com o aumento da CMI, o que pode explicar a resistência diminuída a este antibiótico no grupo inicial de 533 bactérias, tendo em conta o custo que estas alterações têm no crescimento *in vivo* bacteriano [33]. É necessário lembrar que neste momento a prescrição deste antibiótico é inferior a outras classes de antibióticos, o que resulta numa menor pressão selectiva, o que também justifica a susceptibilidade elevada demonstrada a este antibiótico.

Sendo assim, e tendo em conta a falta de alternativas, a elevada susceptibilidade à fosfomicina exibida mundialmente tal como neste estudo, viabilizam este antibiótico como opção na terapêutica, nomeadamente no tratamento de infecções urinárias não complicadas, em que o agente maioritário é *E. coli*, microrganismo para o qual existem *guidelines* para ensaiar a susceptibilidade à fosfomicina.

Porém, é preciso alertar para um aumento da resistência descrito na Espanha, país onde a prescrição é mais frequente, ao contrário de outros países Europeus. Oteo *et al* descreveram em 2010 um aumento global da resistência à fosfomicina em *E. coli* produtora de ESBLs nesse país, associado a um aumento da prescrição e consumo de fosfomicina na comunidade. Este aumento da resistência esteve associado à disseminação do clone O25b-ST131-filogrupo B2 de *E. coli* produtora de CTX-M-15, clone epidémico disseminado pelo mundo e presente em Portugal [81]. Este grupo de investigadores já tinha descrito anteriormente a aquisição de resistência à fosfomicina por parte do clone O25b-ST131-B2 durante um período em que a prescrição de fosfomicina aumentou 50% [27].

É preciso ter em conta que o aumento da prescrição pode desencadear um aumento da resistência, principalmente em microrganismos multirresistentes em que as alternativas são escassas. No entanto, apesar deste aumento da resistência em *E. coli* associada à disseminação de um clone epidémico que adquiriu resistência, segundo estes autores a resistência no seu país permanece diminuída em *E. coli* (2,9%).

4. Conclusão

Em Portugal, não existe qualquer estudo sobre os mecanismos de resistência à fosfomicina, e faltam estudos sobre a susceptibilidade a antibióticos em bactérias responsáveis por infecções urinárias.

A fosfomicina é um antibiótico que pode vir a ter um papel importante, com o aumento da resistência a várias outras classes de antibióticos. A sua associação com o sal de trometamol possui características farmacocinéticas e dinâmicas que o tornam particularmente eficaz no tratamento de infecções urinárias. A maioria das *guidelines* urológicas já recomenda o seu uso nesta patologia, devido à elevada prevalência de estirpes resistentes a antibióticos anteriormente considerados de primeira linha na terapêutica da ITU, nomeadamente quinolonas e trimetoprim/sulfametoxazole. Tendo em conta que as opções disponíveis escasseiam e que novos compostos tardam em surgir, recorrer a antibióticos “antigos” poderá ser a última hipótese. Urge assim a necessidade de novos estudos que comprovem a eficácia da fosfomicina contra vários géneros bacterianos, assim como de normalizar os métodos e critérios de susceptibilidade mundialmente, de modo a alargar o uso deste antibiótico para além das infecções urinárias. Conhecer os mecanismos de resistência em bactérias uropatogénicas, estirpes nas quais a fosfomicina é mais frequentemente usada, é essencial para viabilizá-la como alternativa na era da resistência aos antibióticos.

Este estudo demonstrou que *E. coli* permanece o microrganismo maioritariamente responsável pela ITU, seguido de *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp.. Mesmo neste grupo heterogéneo, a resistência situou-se, de facto, abaixo dos 5%, um valor inferior aos obtidos para todos os outros antibióticos estudados. Além disso, após revisão do método mais adequado para testar a susceptibilidade à fosfomicina, nomeadamente com a adição de glucose-6-fosfato ao meio, esta susceptibilidade aumentou, o que demonstra a importância da optimização da metodologia utilizada.

O estudo da resistência à fosfomicina revelou que esta ocorre essencialmente por mutações cromossomais que afectam o seu transporte para o meio intracelular. No entanto, em *K. pneumoniae*, o gene *fosA*, que codifica uma glutathione transferase capaz de inactivar a fosfomicina, esteve presente em 8 dos 9 isolados, isolados estes com perfis genómicos de ERIC-PCR diferentes.

É de notar que, apesar de parecer haver diferentes veículos de disseminação da resistência à fosfomicina, esta permanece reduzida. Isto pode acontecer devido a vários factores. Em Portugal a fosfomicina é prescrita com pouca frequência, em detrimento de outros antibióticos, o que reduz a pressão selectiva na comunidade para disseminar microrganismos resistentes. Por outro lado, neste estudo, a presença de FosA não foi suficiente para causar Concentrações Mínimas Inibitórias superiores ao *breakpoint* de resistência. Sendo assim, o facto de a

resistência ocorrer maioritariamente por alterações do transporte, devido ao número de genes alvo onde estas mutações podem ocorrer (*glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *cyaA*, *pstI*), ter um custo biológico e causar perda de *fitness in vivo* faz com que estes clones mutados não se disseminem facilmente.

Por outro lado, não parece haver resistência cruzada entre a fosfomicina e outras classes de antibióticos. No caso das β -lactamases, os genes de resistência estão presentes em plasmídeos que possuem vários determinantes de resistência, o que gera a disseminação horizontal da multiresistência intra e interespecies bacterianas. No caso da fosfomicina, uma das possibilidades de ocorrer resistência cruzada é através do gene *fosA*. Porém, como já foi referido, este estudo demonstrou que a sua presença apenas, sem outro mecanismo de resistência, apesar de aumentar a CMI da fosfomicina, não causa resistência. Tendo em conta que a fosfomicina é prescrita essencialmente na sua forma associada ao sal de trometamol, que atinge concentrações muito elevadas na urina até 72 horas após uma dose única de 3g, é possível que a pressão criada não seja suficiente para seleccionar na comunidade um plasmídeo que possua o gene *fosA*. Por outro lado, o facto de cada isolado possuir um perfil de resistência aos antibióticos específicos aponta para o facto de não existir um plasmídeo predominante que transmita *fosA* em conjunto com outros determinantes genéticos de resistência.

É possível com este estudo concluir que:

1. A etiologia da infecção do tracto urinário, no que diz respeito a microrganismos de Gram negativo, segue a tendência mundial com *E. coli* a ser responsável por mais de 80% das infecções;
2. A resistência à fosfomicina, nestes isolados, é inferior a 5%, e em *E. coli* é de 2,05%, muito inferior a outros antibióticos usados empiricamente no tratamento de infecções urinárias;
3. A resistência ocorre essencialmente por mutações cromossomais nos transportadores que estão descritas como afectando o *fitness* bacteriano *in vivo*, o que impede a sua selecção e disseminação;
4. Espécies de *K. pneumoniae* que possuíam o gene *fosA*, mas sem qualquer alteração no transporte de fosfomicina, apresentaram susceptibilidade;
5. Não há resistência cruzada com outras classes de antibióticos;
6. Estes factores demonstram que a fosfomicina pode ser uma alternativa não só em infecções urinárias, mas também para além do tracto urinário.

5. Bibliografia

1. Foxman B (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 113 Suppl 1A: 5S-13S.
2. Hooton TM, Besser R, Foxman B, Fritsche TR, Nicolle LE (2004). Acute uncomplicated cystitis in an era of increasing antibiotic resistance: a proposed approach to empirical therapy. *Clin Infect Dis* 39: 75-80.
3. Pallett A, Hand K (2010). Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 65 Suppl 3: iii25-33.
4. Ronald A (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 113 Suppl 1A: 14S-19S.
5. Kahlmeter G (2003). Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in Europe. The ECO.SENS study. *Int J Antimicrob Agents* 22 Suppl 2: 49-52.
6. Narciso A, Fonseca F, Cerqueira SA, Duarte A (2011). Susceptibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010. *Acta Urol* 28: 16-21.
7. Abraham EP, Chain E (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 10: 677-678.
8. Bradford PA (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14: 933-951, table of contents.
9. Paterson DL, Bonomo RA (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18: 657-686.
10. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, *et al* (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* 11: 54-61.
11. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, *et al* (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59: 165-174.
12. Canton R, Coque TM (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9: 466-475.
13. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 56: 52-59.
14. Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, *et al* (2007). High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. *J Antimicrob Chemother* 60: 1370-1374.
15. Nordmann P, Cuzon G, Naas T (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 9: 228-236.

16. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, *et al* (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10: 597-602.
17. Jacoby GA (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 2: S120-126.
18. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, *et al* (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Science* 166: 122-123.
19. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H (1974). The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* 235: 364-386.
20. Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C (2010). Fosfomicin: an old, new friend? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 127-142.
21. Foltz EL, Wallick H, Rosenblum C (1969). Pharmacodynamics of phosphonomycin after oral administration in man. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 9: 322-326.
22. Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME (2010). Synergy of fosfomicin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol* 66: 359-368.
23. Roussos N, Karageorgopoulos DE, Samonis G, Falagas ME (2009). Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomicin for the treatment of patients with systemic infections. *Int J Antimicrob Agents* 34: 506-515.
24. Reeves DS (1994). Fosfomicin trometamol. *J Antimicrob Chemother* 34: 853-858.
25. Suarez JE, Mendoza MC (1991). Plasmid-encoded fosfomicin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 791-795.
26. Castaneda-Garcia A, Rodriguez-Rojas A, Guelfo JR, Blazquez J (2009). The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomicin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 191: 6968-6974.
27. Oteo J, Orden B, Bautista V, Cuevas O, Arroyo M, *et al* (2009). CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother* 64: 712-717.
28. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, *et al* (2010). Molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 35: 333-337.
29. Tsuruoka T, Yamada Y (1975). Characterization of spontaneous fosfomicin (phosphonomycin)-resistant cells of *Escherichia coli* B in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 28: 906-911.
30. Dulaney EL, Ruby CL (1977). In vitro development of resistance to fosfomicin. *J Antibiot (Tokyo)* 30: 252-261.
31. Andrews JM, Baquero F, Beltran JM, Canton E, Crokaert F, *et al* (1983). International collaborative study on standardization of bacterial sensitivity to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother* 12: 357-361.

32. Clinical and Laboratory Standards (CLSI) (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S21, Wayne, Pa.
33. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI (2003). Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2850-2858.
34. Li Pira G, Pruzzo C, Schito GC (1987). Monuril and modification of pathogenicity traits in resistant microorganisms. *Eur Urol* 13 Suppl 1: 92-97.
35. Mendoza C, Garcia JM, Llaneza J, Mendez FJ, Hardisson C, *et al* (1980). Plasmid-determined resistance to fosfomicin in *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 215-219.
36. Garcia-Lobo JM, Ortiz JM (1982). Tn2921, a transposon encoding fosfomicin resistance. *J Bacteriol* 151: 477-479.
37. Seoane A, Sangari FJ, Lobo JM (2010). Complete nucleotide sequence of the fosfomicin resistance transposon Tn2921. *Int J Antimicrob Agents* 35: 413-414.
38. Arca P, Rico M, Brana AF, Villar CJ, Hardisson C, *et al* (1988). Formation of an adduct between fosfomicin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1552-1556.
39. Arca P, Hardisson C, Suarez JE (1990). Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomicin resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 844-848.
40. Xu H, Miao V, Kwong W, Xia R, Davies J (2011). Identification of a novel fosfomicin resistance gene (*fosA2*) in *Enterobacter cloacae* from the Salmon River, Canada. *Letts Appl Microbiol* 52: 427-429.
41. Wachino J, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y (2010). Prevalence of fosfomicin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomicin-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3061-3064.
42. Zilhao R, Courvalin P (1990). Nucleotide sequence of the *fosB* gene conferring fosfomicin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 56: 267-272.
43. Cao M, Bernat BA, Wang Z, Armstrong RN, Helmann JD (2001). FosB, a cysteine-dependent fosfomicin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183: 2380-2383.
44. Fillgrove KL, Pakhomova S, Schaab MR, Newcomer ME, Armstrong RN (2007). Structure and mechanism of the genomically encoded fosfomicin resistance protein, FosX, from *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* 46: 8110-8120.
45. Garcia P, Arca P, Evaristo Suarez J (1995). Product of *fosC*, a gene from *Pseudomonas syringae*, mediates fosfomicin resistance by using ATP as cosubstrate. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1569-1573.

46. McCoy AJ, Sandlin RC, Maurelli AT (2003). In vitro and in vivo functional activity of Chlamydia MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomicin resistance. *J Bacteriol* 185: 1218-1228.
47. De Smet KA, Kempell KE, Gallagher A, Duncan K, Young DB (1999). Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomicin resistance of recombinant MurA from Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology* 145 (Pt 11): 3177-3184.
48. Kumar S, Parvathi A, Hernandez RL, Cadle KM, Varela MF (2009). Identification of a novel UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) from Vibrio fischeri that confers high fosfomicin resistance in Escherichia coli. *Arch Microbiol* 191: 425-429.
49. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2011). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 1.3, January 5, 2011. Disponível em <http://www.eucast.org/>, acessado a 10 de Fevereiro de 2011.
50. British Society for Antimicrobial Chemotherapy (2011). BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing, Version 10.2 May 2011. Disponível em <http://www.bsac.org.uk/>, acessado a 17 de Junho de 2011.
51. Brizio A, Vasco S, Goncalves AR, Lito LM, Cristino JM, et al. (2006). Survey of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolates from a Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the blaCTX-M-9 gene. *Int J Antimicrob Agents* 28: 320-324.
52. Adamus-Bialek W, Wojtasik A, Majchrzak M, Sosnowski M, Parniewski P (2009). (CGG)₄-based PCR as a novel tool for discrimination of uropathogenic Escherichia coli strains: comparison with enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol* 47: 3937-3944.
53. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, et al (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63: 219-228.
54. Conceicao T, Brizio A, Duarte A, Lito LM, Cristino JM, et al (2005). First description of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 477-478.
55. Barroso H, Freitas-Vieira A, Duarte A (1999). Molecular characterization of a ceftazidime-resistant Morganella morganii isolate producing a TEM-10 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 434-435.
56. Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, et al (1998). beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, and Proteus mirabilis isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1350-1354.
57. Navarro F, Perez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, et al (2001). CMY-2-producing Salmonella enterica, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Proteus mirabilis and Escherichia coli strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J Antimicrob Chemother* 48: 383-389.

58. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ (2002). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 40: 3121-3126.
59. Mammeri H, Poirel L, Fortineau N, Nordmann P (2006). Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2573-2576.
60. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM (1995). OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1881-1884.
61. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 583-588.
62. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 185-191.
63. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, *et al* (2001). Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 723-726.
64. Mehnert-Kay SA (2005). Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. *Am Fam Physician* 72: 451-456.
65. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2009). EARSS Annual Report 2008. Disponível em <http://www.rivm.nl/earss/>, acessado a 13 de Setembro de 2010.
66. Grabe M, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, Çek M, Naber K, *et al* (2010). Guidelines on Urological Infections. *European Association of Urology*.
67. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, *et al* (2011). International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 52: e103-120.
68. Katsarolis I, Poulakou G, Athanasia S, Kourea-Kremastinou J, Lambri N, *et al* (2010). Acute uncomplicated cystitis: from surveillance data to a rationale for empirical treatment. *Int J Antimicrob Agents* 35: 62-67.
69. Kahlmeter G (2003). An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *J Antimicrob Chemother* 51: 69-76.
70. Paul M, Bishara J, Levcovich A, Chowders M, Goldberg E, *et al* (2010). Effectiveness and safety of colistin: prospective comparative cohort study. *J Antimicrob Chemother* 65: 1019-1027.
71. Barry AL, Fuchs PC (1991). In vitro susceptibility testing procedures for fosfomicin tromethamine. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1235-1238.

72. Lopez-Cerero L, de Cueto M, Diaz-Guerrero MA, Morillo C, Pascual A (2007). Evaluation of the Etest method for fosfomicin susceptibility of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 59: 810-812.
73. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, *et al* (2010). In vitro activity of fosfomicin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 526-529.
74. Bernat BA, Laughlin LT, Armstrong RN (1999). Elucidation of a monovalent cation dependence and characterization of the divalent cation binding site of the fosfomicin resistance protein (FosA). *Biochemistry* 38: 7462-7469.
75. Rife CL, Pharris RE, Newcomer ME, Armstrong RN (2002). Crystal structure of a genomically encoded fosfomicin resistance protein (FosA) at 1.19 Å resolution by MAD phasing off the L-III edge of TI(+). *J Am Chem Soc* 124: 11001-11003.
76. Beharry Z, Palzkill T (2005). Functional analysis of active site residues of the fosfomicin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 280: 17786-17791.
77. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, Salcioglu M, Carattoli A, *et al* (2008). Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol* 46: 1110-1112.
78. Novais A, Baquero F, Machado E, Canton R, Peixe L, *et al* (2010). International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating enterobacteriaceae clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 825-834.
79. Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H (1997). Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 943-949.
80. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, *et al* (2001). SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2856-2861.
81. Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, *et al* (2010). Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 65: 2459-2463.