

**Bibiana Maria Lima Marques**

Avaliação dos perfis de resistência a antibióticos em *Escherichia coli* provenientes de  
infecções urinárias adquiridas na comunidade

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015



**Bibiana Maria Lima Marques**

Avaliação dos perfis de resistência a antibióticos em *Escherichia coli* provenientes de  
infecções urinárias adquiridas na comunidade

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015

**Bibiana Maria Lima Marques**

Avaliação dos perfis de resistência a antibióticos em *Escherichia coli* provenientes de  
infecções urinárias adquiridas na comunidade

Assinatura

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Clínica sob a orientação do Professor Doutor João Carlos de Sousa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e co-orientação da Dra Alexandra Gomes da Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres

## SUMÁRIO

As infecções do trato urinário (ITU) são das infecções mais frequentes na comunidade, sendo *E. coli* o principal agente etiológico. O conhecimento da realidade epidemiológica no que concerne aos padrões de suscetibilidade aos vários antibióticos utilizados no tratamento de ITU é de extrema importância, permitindo assim a escolha mais adequada em contexto de terapia empírica.

No tratamento da ITU são utilizados antibióticos de eliminação urinária, nomeadamente  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, sulfanamidas, fosfomicina e nitrofurantoína, sendo os antibióticos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos um dos mais utilizados no tratamento de infecções causadas por *Escherichia coli*. No entanto, com o surgimento de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs), qAmpCs e/ou carbapenemases a eficácia deste grupo de antimicrobianos tem vindo a diminuir. Os genes codificantes destes mecanismos de resistência podem estar inseridos em elementos móveis (plasmídeos) que podem incluir também genes de resistência a outros grupos de antibióticos, limitando ainda mais as opções terapêuticas.

Com a realização do presente trabalho pretende-se avaliar os padrões de suscetibilidade aos vários antibióticos utilizados no tratamento da ITU de 480 isolados de *E. coli* provenientes de amostras de urina de pacientes que requisitaram exame bacteriológico de urina em um laboratório da comunidade; investigar a ocorrência e a diversidade de genes que codificam para ESBLs (*bla*<sub>ESBL</sub>) ou qAmpC (*bla*<sub>qAmpC</sub>) nos isolados identificados como presumíveis produtores de ESBLs e/ou qAmpC; assim como avaliar a co-resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos nos isolados produtores de ESBLs e/ou qAmpCs.

A identificação da espécie bacteriana e a avaliação da susceptibilidade aos vários antibióticos foram realizadas utilizando o sistema automático VITEK®2 Systems. A caracterização dos isolados identificados como presumíveis produtores de ESBLs incluiu a realização do teste do duplo sinergismo e a identificação de genes *bla*<sub>ESBL</sub>

(*bla*<sub>TEM</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>CTX-M</sub>) por PCR e sequenciação. Nos isolados identificados como possíveis produtores de qAmpC foi realizada a identificação de genes *bla*<sub>qAmpC</sub> por PCR e sequenciação.

Nos 480 isolados de *E. coli* estudados, 94% foram provenientes de pacientes do gênero feminino. A classe etária dos 61 aos 75 anos foi associada a uma maior ocorrência de ITU em ambos os gêneros. Na avaliação da susceptibilidade aos diferentes antibióticos verificou-se uma elevada resistência à ampicilina (42,9%), ao trimetropim-sulfametoxazol (23,1%) e a antibióticos do grupo das quinolonas, destacando-se o ácido nalidixico (28,6%). As taxas de resistência à nitrofurantoína (1,7%) ou à fosfomicina (2,1%) foram baixas, pelo que ambos constituíram ainda alternativas eficazes no tratamento de ITU na comunidade. Nenhum isolado de *E. coli* apresentou resistência aos carbapenemos.

A expressão de ESBLs foi observada em 3% (14/480) dos isolados de *E. coli*. Os genes *bla*<sub>ESBL</sub> foram identificados como *bla*<sub>CTX-M</sub> (*bla*<sub>CTX-M-14</sub> e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) (n=12) ou *bla*<sub>SHV</sub> (*bla*<sub>SHV-12</sub>) (n=2). Em 4 isolados de *E. coli* foi detetado um fenótipo compatível com a produção de qAmpC, sendo que em todos foi identificado o gene *bla*<sub>CMY-2</sub>. Verificou-se ainda a co-produção de ESBLs e qAmpC (*bla*<sub>SHV-12</sub>/*bla*<sub>CMY-2</sub>) (n=1). Em 12 dos isolados produtores de ESBLs e em 1 dos isolados produtores de qAmpC foram observados fenótipos de multiresistência.

Este estudo demonstra que a disseminação na comunidade de *E. coli* resistentes a múltiplos antibióticos é uma realidade preocupante, limitando as opções terapêuticas e contribuindo para o insucesso do tratamento da ITU, sobretudo em contexto de terapia empírica.

## ABSTRACT

Urinary tract infections (UTI) are the most common infections in the community, with *Escherichia coli* constituting the most commonly identified etiologic agent. Knowledge of the epidemiological reality regarding the susceptibility patterns to various antibiotics used in the treatment of UTI is extremely important, allowing the most appropriate antibiotic choice in the context of empiric therapy.

For the treatment of UTI are frequently used antibiotics with a high rate of urinary elimination, including  $\beta$ -lactams, quinolones, sulfanamides, fosfomycin and nitrofurantoin, the group of  $\beta$ -lactams being one of the most widely used in infections caused by *E. coli*. However, the emergence of bacteria producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), qAmpCs and/or carbapenemases has been largely compromising the effectiveness of this antimicrobial group. The genes encoding these resistance mechanisms may be inserted in mobile genetic elements (plasmids) that may also include resistance genes to other groups of antibiotics, further limiting the therapeutic options.

In this study we aim to assess the susceptibility patterns to various antibiotics used in the treatment of UTI among 480 *E. coli* isolates recovered from urine samples of patients who ordered bacteriological examination of urine in a community laboratory; to investigate the occurrence and diversity of genes encoding ESBLs (*bla*<sub>ESBL</sub>) and/or qAmpC (*bla*<sub>qAmpC</sub>) in isolates identified as presumable ESBL and/or qAmpC producers; and also to evaluate the co-resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotics among ESBLs and/or qAmpC producers.

Bacterial identification and susceptibility to various antibiotics were carried out using the automatic VITEK®2 Systems. Characterization of isolates identified as ESBLs producers included the of double synergism test (DDST) and the identification of *bla*<sub>ESBL</sub> (*bla*<sub>TEM</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>CTX-M</sub>) genes by PCR and sequencing. In isolates identified as possible qAmpC producers, detection and identification *bla*<sub>qAmpC</sub> genes was performed by PCR and sequencing.

Among the 480 *E. coli* isolates analysed in this study, 94% were from female patients. The age group from 61 to 75 years old presented higher incidence of UTI in both genders. Isolates were frequently resistant to ampicillin (42.9%), trimethoprim-sulfamethoxazole (23.1%), and quinolones, mainly to nalidixic acid (28.6 %). Resistance rates to nitrofurantoin (1.7%) or fosfomycin (2.1%) were lower, and hence both still constitute effective alternatives in the treatment of UTI in the community. None *E. coli* isolate showed resistance to carbapenems.

The ESBLs expression was observed in 3% (14/480) of the *E. coli* isolates. The *bla*<sub>ESBL</sub> genes were identified as *bla*<sub>CTX-M</sub> (*bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) (n=12) or *bla*<sub>SHV</sub> (*bla*<sub>SHV-12</sub>) (n=2). In four isolates, a phenotype compatible with production qAmpC was detected, and in all of them a *bla*<sub>CMY-2</sub> gene was identified. The co-production of ESBLs and qAmpC (*bla*<sub>SHV-12</sub>/*bla*<sub>CMY-2</sub>) was also observed (n=1). A multidrug resistance phenotype was found in 1 qAmpC- and in 12 ESBL-producing isolates.

This study shows that the spread in the community of *E. coli* resistant to multiple antibiotics constitutes a disturbing reality, limiting treatment options and contributing to failures in the treatment of UTI, especially in the context of empiric therapy.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor João Carlos de Sousa,

Muito obrigada, por aceitar ser orientador desta tese, por acreditar que eu era capaz de realizar esta tese, mesmo sabendo que iria ser difícil. Por me ter transmitido bastante conhecimento e me ter ajudado nas várias etapas da realização desta tese.

À Professora Doutora Elisabete Machado,

Muito obrigada, pela grande ajuda que sempre me deu ao longo de toda a realização desta tese, pelo conhecimento transmitido que me permitiram crescer profissionalmente e como pessoa e pela disponibilidade que sempre teve.

À Dra. Alexandra Gomes,

Muito obrigada, por ter aceitado ser minha co-orientadora desta tese, pela disponibilidade que sempre teve, pelo apoio e incentivo que sempre me deu e pela ajuda e compreensão que sempre teve no meu local de trabalho.

À Carla Rodrigues e Teresa Gonçalves,

Obrigada, pela ajuda que me deram na realização da parte prática desta tese no laboratório de Microbiologia da CEBIMED (na Faculdade de Ciências da Saúde na Faculdade Fernando Pessoa) e pela partilha de alguns conhecimentos.

Ao António José Espogeira (Informático da Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres),

Obrigada, pela disponibilidade que sempre teve para me ajudar na recolha dos dados da amostra que foi estudada nesta tese.

À Dra. Helena Torres (ex-Diretora Técnica da Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres),

Obrigada, por ter permitido, incentivado e facilitado o ingresso no mestrado, pois concedeu a alteração de horários no meu local de trabalho.

À Dra. Paula Ramalho,

Obrigada, pelo incentivo e ajuda na decisão da realização deste mestrado.

À Dra. Lucinda Coentrão (responsável Técnica da Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres),

Obrigada, por me conceder a facilidade de horários e me incentivar a realização da tese.

À Dra Andrea Afonso e a todos os meus colegas do setor de microbiologia da medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres,

Obrigada, pela disponibilidade que sempre tiveram para poder me ausentar e pelo apoio que sempre me deram,

Agradeço a todos as pessoas que contribuíram para a realização desta tese,

A Todos o meu muito Obrigada!

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE GRÁFICOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. INFEÇÃO DO TRATO URINÁRIO .....	1
1.1 Etiologia da infecção urinária .....	3
1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	3
2. PATOGENESE DA INFEÇÃO URINÁRIA .....	4
2.1. Principais fatores de virulência em <i>E.coli</i> que lhe confere uropatogenicidade: .....	5
3. DIAGNÓSTICO DA ITU .....	8
3.1. Colheita da amostra .....	8
3.2. Exame sumário de urina .....	9
3.3. Exame direto – Coloração de Gram .....	9
3.4. Exame cultural de urina .....	9
4. TRATAMENTO INFEÇÃO URINÁRIA .....	11
4.1 Terapêutica antimicrobiana .....	11
4.1.1 Antibióticos antiparietais .....	13
4.1.1.1 Antibióticos antiparietais (fase citoplasmética) .....	24
4.1.1.1.1 Fosfomicina .....	24
4.1.1.1.2 Antibióticos antiparietais (fase membranar) .....	27
4.1.1.1.2.1 Glicopeptídeos .....	27
4.1.1.3 Antibióticos antiparietais (fase parietal) .....	28
4.1.1.3.1 Beta-lactâmicos .....	28
4.1.1.3.1.1 Mecanismo de ação .....	29
4.1.1.3.1.2 Resistência bacteriana .....	30
A - Modificação dos alvos (PBPs) .....	32
B - Impermeabilização da membrana externa .....	33
C - Bombas de efluxo .....	34
D - Hidrólise enzimática dos $\beta$ – lactâmicos por $\beta$ – lactamases .....	34
D.1 $\beta$ – lactamases de espectro alargado (ESBLs) .....	38

D.1.1. $\beta$ – lactamases de largo espectro do tipo TEM e SHV .....	39
D.1.2. $\beta$ – lactamases de largo espectro CTX-M .....	40
D.1.3. $\beta$ – lactamases de largo espectro do tipo OXA .....	43
D.2. $\beta$ – lactamases do tipo AmpC .....	44
D.2.1. $\beta$ – lactamases AmpC de localização cromossômica.....	44
D.2.2. $\beta$ – lactamases do tipo AmpC plasmídicas (qAmpC) .....	46
D.3. Carbapenemases.....	48
4.1.1.4 Co-resistências aos diferentes antibióticos .....	51
4.1.1.5. Epidemiologia das resistências bacterianas.....	52
4.1.2 Antibióticos inibidores da síntese proteica.....	58
4.1.2.1 Aminoglicosídeos – Aminociclítóis .....	58
4.1.3 Antibióticos inibidores da síntese os ácidos nucleicos .....	60
4.1.3.1 Quinolonas.....	60
4.1.4 Antibióticos antimetabolitos.....	64
4.1.4.1 Sulfonamidas.....	64
4.1.4.2 Trimetropim .....	64
4.1.4.3 Sulfanamidas / Trimetropim.....	65
4.1.4.4 Nitrofurantoína.....	65
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>67</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
1. Isolados bacterianos .....	68
2. Identificação bacteriana.....	68
3. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos.....	68
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
<b>V. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>82</b>
<b>VI. CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>VII. Bibliografia.....</b>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DO TRACTO URINÁRIO.....	2
FIGURA 2. ADESINAS FIMBRIAS (SETA) DE ESTIRPE UROPATOGÉNICA DE <i>E. COLI</i> . .....	6
FIGURA 3. <i>E. COLI</i> EXIBINDO FLAGELOS (F) E FIMBRIAS (F).....	7
FIGURA 4. PRINCIPAIS ALVOS DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS NA BACTÉRIA.....	12
FIGURA 5. ESQUEMA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PEPTIDOGLICANO. ....	14
FIGURA 6. BIOSÍNTESE NO CITOPLASMA BACTERIANO DE UDP-NAG E UDP-NAM-PENTAPEPTÍDEO.....	15
FIGURA 7. TRANSPORTE DE UDP-NAM-PENTAPEPTÍDEO E UDP-NAG ATRAVÉS DA MC.....	16
FIGURA 8. INSERÇÃO DA SUBUNIDADE UDP-NAG-NAM-PENTAPEPTÍDEO NA PC “VELHA”. ....	17
FIGURA 9. ANTIBIÓTICOS ATIVOS NAS DIFERENTES FASES DA BIOSÍNTESE DO PEPTIDOGLICANO. ....	17
FIGURA 10. PC DE BACTÉRIA DE GRAM POSITIVO.. .....	18
FIGURA 11. CÉLULA DE <i>E. COLI</i> (ME)... .....	19
FIGURA 12. PAREDE CELULAR GRAM NEGATIVO, PERMEABILIDADE SELECTIVA AOS ANTIBIÓTICOS. ....	20
FIGURA 13. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PEPTIDOGLICANO DE <i>E. COLI</i> .....	20
FIGURA 14. ESTRUTURA QUÍMICA DA FOSFOMICINA (À ESQUERDA) E DO FOSFOENOLPIRUVATO .....	25
FIGURA 15. DIFERENTES CLASSES BETALACTÂMICOS .....	28
FIGURA 16. ULTRAESTRUTURA DA PC DE BACTÉRIAS DE GRAM POSITIVO E DE GRAM NEGATIVO.....	30
FIGURA 17. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS B – LACTÂMICOS, .....	31
FIGURA 18. DIAGRAMA DOS DIFERENTES GRUPOS CTX-M.....	40
FIGURA 19. COMPLEXIDADE HERARQUICA DO GENE bla CTX-M.....	42
FIGURA 20. ESCHERICHIA COLI: PERCENTAGEM (%) DE ISOLADOS INVASIVOS COM RESISTÊNCIA ÀS CEFALOSPORINAS DE 3ª GERAÇÃO POR PAÍS, PAÍSES DA EU/EEA, 2013. ....	55
FIGURA 21. <i>ESCHERICHIA COLI</i> : PERCENTAGEM (%) DE ISOLADOS INVASIVOS COM RESISTÊNCIA ÀS FLUOROQUINOLONAS, POR PAÍS, PAÍSES DA EU/EEA, 2013.....	57
FIGURA 22. <i>ESCHERICHIA COLI</i> : PERCENTAGEM (%) DE ISOLADOS INVASIVOS COM RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS, POR PAÍS, PAÍSES DA EU/EEA, 2013.....	57
FIGURA 23. <i>ESCHERICHIA COLI</i> : PERCENTAGEM (%) DE ISOLADOS INVASIVOS COM RESISTÊNCIA COMBINADA ÀS CEFALOSPORINAS DE 3ª GERAÇÃO, FLUOROQUINOLONAS E AMINOGLICOSÍDEOS, EU/EEA, 2013..	58

## ÍNDICE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. OCORRÊNCIA DE DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS EM AMOSTRAS DE URINA DE PACIENTES COM ITU NO PERÍODO TEMPORAL (DEZEMBRO 2011-MARÇO 2012). .....	73
GRÁFICO 2. DISTRIBUIÇÃO POR GÊNERO DOS PACIENTES COM ITUCAUSADAS POR E.COLI INCLUÍDAS NESTE ESTUDO. ....	74
GRÁFICO 3. OCORRÊNCIA DE ITU POR CLASSE ETÁRIA. ....	75
GRÁFICO 4. PERCENTAGEM DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS. ....	76
GRÁFICO 5. PERCENTAGEM DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NÃO B-LACTÂMICOS. ....	76
GRÁFICO 6. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS EM ISOLADOS CONTENDO <i>BLA<sub>ESBLs</sub></i> E/OU <i>BLA<sub>QAMPc</sub></i> . ....	78
GRÁFICO 7. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS NÃO B-LACTÂMICOS EM ISOLADOS CONTENDO <i>BLA<sub>ESBLs</sub></i> E/OU <i>BLA<sub>QAMPc</sub></i> . ....	79

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: PRINCIPAIS GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS NO TRATAMENTO DA ITU(SOUSA, 2006). ....	12
TABELA 2. ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO DE BETA-LACTAMASES (ADAPTADO DE BUSH <i>ET AL.</i> , 2010). ....	36
TABELA 3. ORIGEM DOS DIFERENTES TIPOS DE ENZIMAS QAMPc (ADAPATADO DE JACOBY, 2009).....	47
TABELA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DAS QUINOLONAS E AS VÁRIAS GERAÇÕES .....	61
TABELA 5. <i>PRIMERS</i> E CONDIÇÕES DE PCR USADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAÇÃO DE GENES <i>BLA<sub>ESBL</sub></i> E <i>BLA<sub>QAMPc</sub></i> .....	72
TABELA 6. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>E. COLI</i> PRODUTORES DE <i>ESBLs</i> E/OU <i>QAMPc</i> DETECTADOS NESTE ESTUDO. ....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACME** – Arginine Catabolic Mobile

**AMC** – Amoxicilina – Ácido clavulânico

**AMI** – Amicacina

**AMP** - Ampicilina

**AmpC** –  $\beta$  – Lactamase AmpC

**bla** – Gene codificante de  $\beta$  – Lactamases

**bla<sub>q</sub>AmpC** - Gene codificante de  $\beta$  – Lactamases adquirida do tipo AmpC

**CA-MRSA** – Community Acquired – MRSA

**CAZ** – Ceftazidima

**CFU** – Unidade formadora de colônia

**CIP** – Ciprofloxacina

**CLSI** – Clinical Laboratory Standards Institute

**CMI** – Concentração Mínima Inibitória

**CNF-1**- Citotoxic necrotizing factor 1 – Fator necrotizante – 1

**CP** – Carboxipeptidases

**CTX** – Cefotaxima

**DA** – Dalton

**DAP** – Diaminopimélico

**DDST** – Teste do duplo sinergismo (Double Disk Sinergy Test)

**DHFR** – Enzima dihidrofolato redutase

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**E. coli** – *Escherichia coli*

**ERT** – Ertapeneme

**ESBL** –  $\beta$  – Lactamase de Espectro Alargado – Extended-Spectrum-  $\beta$  – Lactamase

**EUCAST** – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**FEP** – Cefepime

**FOS** – Fosfomicina

**FOX** – Cefoxitina

**GEN** – Gentamicina

**HA-MRSA** – Hospital Acquired – MRSA

**IMP** – Imipenemo

**ITU** – Infecção trato urinário

**IS** – Sequência de inserção

**LPS** – Lipopolissacarídeos

**MC** – Membrana Citoplasmática

**ME** – Microscopia electrónica

**mRNA** - Ácido ribonucleico mensageiro

**MRSA** – *Staphylococcus aureus* metilina resistentes

**NAG** – N-acetilglucosamina

**NAL** – Ácido nalidixico

**NAM** – Ácido N-acetilmurâmico

**NIT** – Nitrofurantoina

**OM** – Membrana Exterior

**OMP**– Porina - Outer Membrane Proteins

**PABA** – Ácido P-aminobenzoico

**PBP** – Penicillin-Binding-Proteins

**PC** – Parede celular

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase – Polymerase Chain Reaction

**PEP**- Fosfoenolpiruvato

**PM** – Peso molecular

**PVL** – Leucocidina – panton – valentine

**QRDR** – Região determinante da resistência às quinolonas

**Scmec** – Staphylococcus Chromossoma cassette mec

**SXT** – Trimetropim-sulfametoxazol

**TG** – Transglicolases

**TOB** – Tobramicina

**TP** – Transpeptidases

**VISA** - *Staphylococcus aureus* intermédio à Vancomicina

**VRSA** - *Staphylococcus aureus* resistente à Vancomicina

## I. INTRODUÇÃO

### 1. INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

As infecções do trato urinário (ITU) são uma patologia muito frequente, quer na comunidade, quer em meio hospitalar, estando muitas vezes relacionadas com uma diminuição da qualidade de vida, perda de produtividade e custos associados aos cuidados de saúde (Narciso, *et al.*, 2010, Narciso, *et al.*, 2012, Forbes, *et al.*, 2007, Nordstrom, *et al.*, 2013). Embora a maioria das infecções seja aguda e de curta duração, algumas delas podem ter sequelas graves, com comprometimento da função renal, podendo em casos extremos provocar a morte (Narciso, *et al.*, 2010, Narciso, *et al.*, 2012, Martins, *et al.*, 2010).

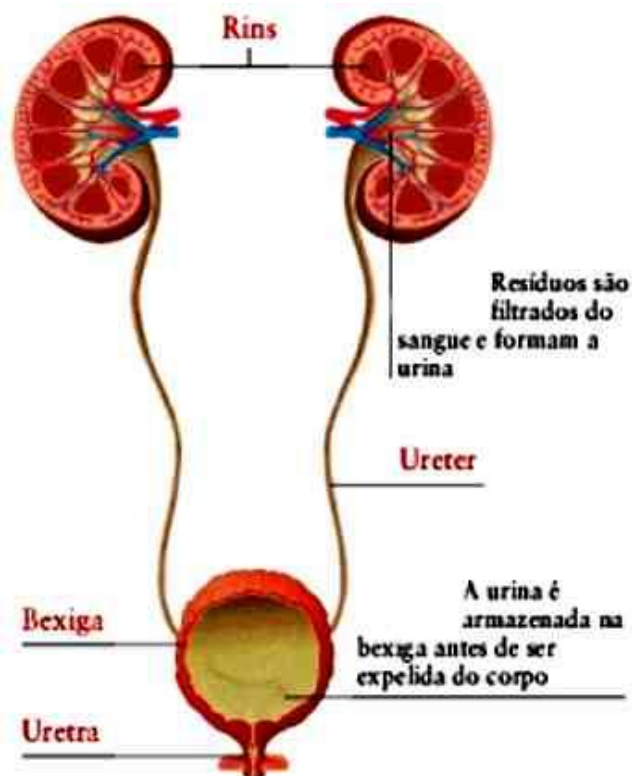
O trato urinário é composto pelos rins, ureteres, bexiga e uretra (Fig.1). A ITU pode ser definida como a invasão e multiplicação de microrganismos nos tecidos do trato urinário desde a uretra até aos rins. Podem ser classificadas como superiores ou inferiores, dependendo do local anatómico da infecção: trato urinário superior (pielonefrite) abrange os uréteres e rins; trato urinário inferior (cistite) compreende a bexiga e uretra (Forbes, *et al.*, 2007, Martins, *et al.*, 2010, Seely, *et al.*, 1995). Estas infecções podem apresentar sintomatologia ou serem assintomáticas (Martins, *et al.*, 2010). A cistite caracteriza-se pela presença de disúria, poliúria, hematuria, ardor ao urinar, micção urgente e pode ser também acompanhada de dor suprapúbica. A urina é por vezes turva e com mau odor (Martins, *et al.*, 2010, Cercenado, *et al.*, 2010, Rodrigues, *et al.*, 2011).

A pielonefrite é uma inflamação de causa infecciosa do parênquima renal e pode manifestar-se por febre, calafrios, dor lombar, náuseas e vômitos (Martins, *et al.*, 2010, Cercenado, *et al.*, 2010, Rodrigues, *et al.*, 2011).

Existem diversos fatores que predis põem a ocorrência de ITU, como, anomalias estruturais ou funcionais do trato genitourinário (tais como cálculos renais, bexiga

neurogênica, ou presença de cateteres uretrais) ou outras condições inerentes a determinadas subpopulações mais susceptíveis a esta patologia, como grávidas, idosos, diabéticos, indivíduos com esclerose múltipla ou com o sistema imunitário debilitado (Narciso, *et al.*, 2012).

A ITU pode ocorrer em todas as idades, desde a neonatal até à idosa, verificando-se ser o género masculino que apresenta maior incidência nos primeiros meses de vida, devido a um maior número de malformações congénitas. A partir deste período e até faixas etárias superiores, é o género feminino que tem maior susceptibilidade para este tipo de infeção. Na vida adulta, a incidência de ITU nas mulheres mantém-se elevada devido à atividade sexual, gestação e menopausa. Esta prevalência deve-se sobretudo à fisiologia do sistema urinário, o comprimento da uretra e a sua localização próxima do ânus e da vagina. Nos homens a ITU está geralmente relacionada com problemas ao nível da próstata, cálculo vesicular, cateterismo e diabetes mellitus (Forbes, *et al.*, 2007, Schor, *et al.*, 2003, Governada *et al.*, 2002, Rodrigues, *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Representação do trato urinário, extraída do site <http://www.webciencia.com>

## 1.1 Etiologia da infecção urinária

A maioria das ITU são originadas por microrganismos de origem entérica, sendo *Escherichia coli* o principal agente etiológico. Nas infecções adquiridas na comunidade *E.coli* têm uma incidência de cerca de 70 a 80%, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, e *Enterococcus spp.* são responsáveis por uma percentagem menos elevada, nas mulheres jovens e sexualmente ativas *Staphylococcus saprophyticus* é um dos principais responsáveis por ITU (Narciso, *et al.*, 2012, Martins, *et al.*, 2010, Governada *et al.*, 2002, Correia, *et al.*, 2007, Rodrigues, *et al.*, 2011, Rolo, *et al.*, 2008, Wright, *et al.*, 2006).

Nas infecções adquiridas a nível hospitalar as estirpes com maior incidência são *Enterobacteriaceae* com predomínio da *Escherichia coli* (cerca de 50 a 60%), *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, também pode ser originada por fungos principalmente pela *Cândida spp* (Rodrigues, *et al.*, 2011, Marques, *et al.*, 2005).

A etiologia das ITUs é maioritariamente de origem bacteriana, podendo também ser causada por vírus ou fungos (Martins, *et al.*, 2010, Andreu, *et al.*, 2011).

## 1.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* um dos principais agentes etiológicos da ITU, pertence à família das *Enterobacteriaceae*. Trata-se de um bacilo de Gram negativo, anaeróbio facultativo, móvel com flagelos peritricos, fermentador da glicose, reação de catalase positiva e oxidase negativa (Sousa, *et al.*, 2000; Barroso, *et al* 2014; Forbes, *et al.*, 2007). Alguns membros da família das *Enterobacteriaceae* apresentam uma distribuição ubiqüitária, fazem parte da flora comensal do Homem e de outros animais mas também constituem uma importante causa de infeção, tanto em ambiente hospitalar como na comunidade, tendo especial destaque a espécie *E. coli* (Sousa, *et al.*, 2000; Barroso, *et. al.*, 2014; Forbes, *et al.*, 2007).

## 2. PATOGENESE DA INFEÇÃO URINÁRIA

A ITU resulta da proliferação de bactérias no trato urinário, sendo este normalmente estéril (Cercenado, *et al.*, 2010, Campos, *et al.*, 2006) A maioria dos microrganismos responsáveis por provocar ITU têm origem na flora do trato intestinal do paciente e atingem o trato urinário por via ascendente, a partir da uretra até à bexiga, podendo por vezes atingir os rins (Chung, 2010, Cercenado, *et al.*, 2010, Rolo, *et al.*, 2008). A ITU resulta da interação entre os fatores de virulência do microrganismo e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Quando existe desequilíbrio entre estes fatores, pode surgir uma ITU (Rolo, *et al.*, 2008).

Certas estirpes bacterianas que ascendem o trato urinário são por vezes eliminadas pelo fluxo urinário, pelas propriedades antibacterianas da urina (alta osmolaridade, elevada concentração de ureia e de ácidos orgânicos e o pH ácido), pela presença de imunoglobulinas  $\text{IgA}$ , pelos leucócitos polimorfonucleares presentes na superfície vesical e também pela presença de inibidores da aderência bacteriana como as proteínas de Tamm-Horsfall (glicoproteína uromucóide que inibe a aderência bacteriana com capacidade de se ligar à fimbria tipo1, impedindo a interação do microrganismo com o uroepitélio) não causando ITU (Cercenado, *et al.*, 2010, Rolo, *et al.*, 2008, Weichhart, *et al.*, 2008; Sâemann, *et al.*; 2005).

Se as bactérias não forem eliminadas iniciam a colonização, adesão do microrganismo ao uroepitélio e sua reprodução, podendo assim causar infeção. O início de infeção depende do equilíbrio entre a virulência das bactérias, o tamanho do inóculo, os mecanismos defensivos locais e a presença ou não de alterações anatómicas ou funcionais do trato urinário (Cercenado, *et al.*, 2010, Rolo, *et al.*, 2008).

A capacidade de adesão de *E.coli* às células uroepiteliais é determinante no desenvolvimento de colonização e infeção, permitindo resistência às forças hidrodinâmicas do fluxo urinário (Domingo, 2013; Barroso, *et al.*, 2014).

As fimbrias de origem proteica são as principais estruturas de aderência a recetores específicos existentes nas membranas das células epiteliais humanas, porque reconhecem os recetores celulares à superfície dos epitélios, permitindo a aderência

bacteriana e tornando assim possível a colonização das mucosas do hospedeiro, que poderá evoluir para infecção (Narciso, *et al.*, 2010).

## 2.1. Principais fatores de virulência em *E.coli* que lhe confere uropatogenicidade:

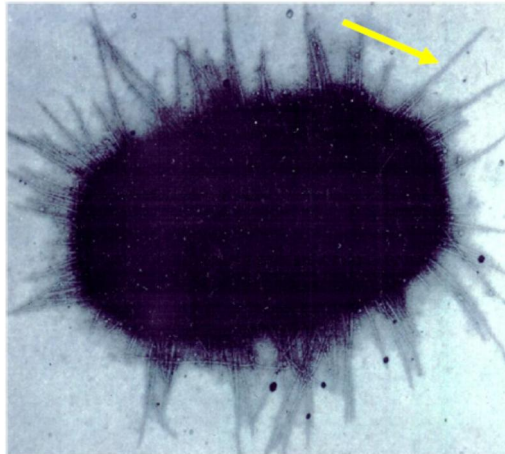
**Adesinas fimbriais** – são estruturas filamentosas presentes na superfície bacteriana, com distribuição peritrica (Fig. 2 e 3), que promovem a aderência a recetores presentes nas células do hospedeiro, tornando possível a colonização bacteriana nas mucosas do hospedeiro (Mulvey, *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2006; Barroso, *et al.*, 2014).

As fimbrias também designadas por adesinas fimbriais, são constituídas predominantemente por aminoácidos apolares tornando a superfície bacteriana hidrofóbica, o que facilita a aproximação as células do hospedeiro.

Nas estirpes uropatogénicas de *E.coli* predominam três tipos de adesinas fimbriais:

- Adesinas fimbriais do tipo 1- medeiam a ligação e invasão do epitélio vesical através da adesina FimH, codificada pelo gene *fimH* do operão *fim*, reconhecem resíduos de manose na superfície do uroepitélio e são o tipo de adesina mais associado à infecção vesical. Este tipo de adesinas é muitas vezes designado por fimbrias manose-sensíveis;
- Adesinas fimbriais do tipo P - adesina PapG, codificada pelo gene *papG*, do operão *pap*, reconhecem recetores nas células do uroepitélio, os glicoesfingolípidos que expressam galactose ( $\alpha$ -1-Gal- $\beta$ -4-Gal) e são por isso designadas por fimbrias manose-resistentes. São predominantemente associadas à pielonefrite;

- Outros tipos de fimbrias - as fimbrias S em que a adesina é Sfas (*operão sfa*), responsável pelo reconhecimento de ácido siálico nos recetores das células dos eritrócitos da bexiga e rins;



**Figura 2.** Adesinas fimbriais (seta) de estirpe uropatogénica de *E. coli* (ME). (imagem cedida por Prof. Dr. J. C. Sousa).

**Cápsula** (antigénio K) – permite à bactéria a existência de uma camada protetora resistente à fagocitose, permite também a adesão ao uroepitélio;

**Flagelo** - permite a mobilidade à bactéria (fig 3);

**Hemolisinas** – toxinas polipeptídicas que originam a lise dos eritrócitos e em *E.coli* a  $\alpha$ -hemolisina codificada pelo gene *hlyA* no operão *hly* apresentam capacidade de destruição eritrocitária, das células endoteliais e do epitélio renal, monócitos e granulócitos;

**Aerobactina** – é um componente presente nas células de *E.coli* com uma ação quelante de iões de ferro, desempenhando um papel importante na sobrevivência de *E.coli* no trato urinário, onde há pouca disponibilidade de iões de ferro;

**Fator necrotizante1 (CNF-1- cytotoxic necrotizing factor 1)** – toxina que penetra na célula do hospedeiro e pode levar à necrose ou apoptose da célula, pode

também originar a degradação do epitélio do aparelho urinário. Em *E. coli* este factor tem um papel importante na passagem da bactéria do sistema urinário para o sistema sanguíneo (Andreu, *et al.*, 2011, Narciso, *et al.*, 2012, Cercenado, *et al.*, 2010, Agarwal, *et al.*, 2012, Lloyd, *et al.*, 2007, Rolo, *et al.*, 2008, Ferreira, *et al.*, 2000, Domingo 2010).



**Figura 3.** *E. coli* exibindo flagelos (F) e fimbrias (f). Imagem cedida por Prof. Dr. J. C. Sousa.

Nem todas as estirpes de *Escherichia coli* possuem a mesma capacidade de provocar infecção do trato urinário e só as estirpes de determinados grupos filogenéticos e com determinados fatores de virulência são capazes de produzir essa infecção (Cercenado, *et al.*, 2010, Rolo, *et al.*, 2008).

Existem em *Escherichia coli* 4 grupos filogenéticos: A (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>), B1, B2 (B<sub>2</sub><sub>2</sub>, B<sub>2</sub><sub>3</sub>) e D (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>). As estirpes de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos A (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>) e ao grupo B1 não estão frequentemente associados à infecção urinária. As estirpes uropatogénicas de *Escherichia coli* pertencem principalmente ao grupo B2 (B<sub>2</sub><sub>2</sub>, B<sub>2</sub><sub>3</sub>) e em menor quantidade ao grupo D (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>) e transportam genes que codificam os fatores de virulência extra-intestinais, como as toxinas, adesinas, lipopolissacarídeos, cápsula, proteases e invasinas (Cercenado, *et al.*, 2010, Rolo, *et al.*, 2008, Pitout, 2012).

Os genes responsáveis pelos fatores de virulência encontram-se no cromossoma bacteriano agrupados em fragmentos de DNA chamados “ilhas de patogenicidade” (PAI), bacteriófagos, plasmídeos e transposões (Andreu, *et al.*, 2011, Narciso, *et al.*,

2010, Cercenado, *et al.*, 2010, Agarwal, *et al.*, 2012, Lloyd, *et al.*, 2007, Wright, *et al.*, 2006).

### 3. DIAGNÓSTICO DA ITU

Perante a suspeita clínica e presença de sintomas associados a ITUs, são essenciais os exames complementares de diagnóstico, nomeadamente o exame sumário da urina (análise física, análise química e observação ao microscópio) e a urocultura. A confirmação do diagnóstico laboratorial da infeção é muito importante dada a presença de estirpes de *E. coli* com a presença de genes de resistência aos antibióticos conducentes à falência da terapêutica com os antibióticos convencionais (Campos, *et al.*, 2006, Rodrigues, *et al.*, 2011, Mendo, *et al.*, 2008).

Atualmente a medicação empírica de um modo convencional tem grandes probabilidades de não ser eficaz (Campos, *et al.*, 2006, Rodrigues, *et al.*, 2011, Mendo, *et al.*, 2008).

#### 3.1. Colheita da amostra

A urina para exame microbiológico deve ser colhida de forma asséptica, sendo requerido jato médio de urina, após a lavagem cuidadosa da área genital com água e sabão, sem uso de anti-sépticos e eliminação do primeiro jato. Em crianças usar saco coletor ou quando necessário recorrer a colheita supra púbica da urina vesical (Campos, *et al.*, 2006, Rodrigues, *et al.*, 2011, Fonseca, *et al.*, 2004). Depois de colhida a amostra de urina deve ser transportada ao laboratório o mais rápido possível, uma vez que deverá ser semeada no máximo até uma hora após a colheita, e no caso de não ser possível, deverá ser refrigerada a 4° C e processada até às 24 horas após a colheita (Cercenado, *et al.*, 2010, Campos, *et al.*, 2006, Fonseca, *et al.*, 2004).

### 3.2. Exame sumário de urina

O exame sumário de urina é composto por diversas observações laboratoriais conducentes ao diagnóstico clínico da ITU.

Inclui a presença na urina de:

1. Piúria (teste da esterase leucocitária);
2. A presença de nitritos (negativo para bactérias não produtoras de nitrato-reductase, como acontece em *Enterococcus spp*, *Staphylococcus saprophyticus* e em bacilos de Gram negativo não fermentativos);
3. Bacteriúria geralmente com UCF  $\geq 10^5$ /mL;
4. Hematúria, frequentemente sem bacteriúria e piúria, sendo relevante nesta situação a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*. (Rodrigues, *et al.*, 2011)

### 3.3. Exame direto – Coloração de Gram

A observação de esfregaço de urina, corado pela técnica de Gram, permite avaliar a probabilidade de ITU.

### 3.4. Exame cultural de urina

A sementeira de urina em meio de cultura deve ser realizada de forma semi-quantitativa usando ansas calibradas de 0,01 ou 0.001 ml, permitindo assim contabilizar o número de UFC/ml dos microrganismos presentes na amostra e obter colónias isoladas para permitir uma identificação e antibiograma (Rodrigues, *et al.*, 2011, Cercenado, *et al.*, 2010, Fonseca, *et al.*, 2004).

Os **meios de cultura** utilizados podem ser de três tipos: meios diferenciais não selectivos como por exemplo o meio Cled agar; meios diferenciais adaptados ou meios diferenciais não selectivos cromogénicos. Cada tipo de meios apresenta as suas vantagens e inconvenientes, ficando ao critério de cada instituição a sua escolha. Os

meios de cultura incubam em atmosfera de aerobiose a 36°C +/- 1°C durante 18 a 24 horas, podendo haver necessidade de prolongar a incubação por 48 horas (Rodrigues, *et al.*, 2011, Cercenado, *et al.*, 2010, Fonseca, *et al.*, 2004).

Na interpretação dos resultados das uroculturas, é considerado uma urocultura positiva quando a contagem é  $\geq$  a  $10^5$  UCF/ml. No entanto, em determinadas circunstâncias, poderá admitir-se uma contagem menor, como em amostras de urinas obtidas por punção suprapúbica (nestes casos qualquer contagem é significativa) (Rodrigues, *et al.*, 2012, Fonseca, *et al.*, 2004, Rolo, *et al.*, 2008).

Para interpretação do antibiograma deve ser seguida uma metodologia padronizada recomendada pelo EUCAST (European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing) ou pelo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (Cantón, 2010). A atividade antimicrobiana sobre *E. coli* pode ser avaliada de um modo qualitativo (método de difusão em disco de papel) e de um modo quantitativo com a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), expressa em  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados podem variar de acordo com as condições experimentais e o foco de infecção (Soriana-García, 2010).

O resultado pode ser classificado em:

- **Sensível** - quando o microorganismo é inibido, *in vitro*, por uma concentração de antibiótico, que está associado a uma elevada possibilidade de sucesso terapêutico;
- **Resistência intermédia** - quando o microorganismo é inibido, *in vitro*, por uma concentração de antibiótico que está associada a um efeito terapêutico incerto;
- **Resistente** - quando o microorganismo, *in vitro*, não é inibido pelo antibiótico (Rodloff, *et al.*, 2008, Canton, 2010).

A identificação do agente causador de infecção e o respetivo antibiograma permite uma orientação terapêutica eficaz, mas o tempo necessário para a obtenção destes resultados faz com que por vezes seja necessário iniciar uma terapêutica empírica (Rolo, *et al.*, 2008).

O início de uma terapêutica empírica nem sempre tem sucesso, sendo muito importante a realização do antibiograma, de modo a permitir que se corrija a terapêutica a prosseguir no tratamento de ITU.

#### 4. TRATAMENTO INFEÇÃO URINÁRIA

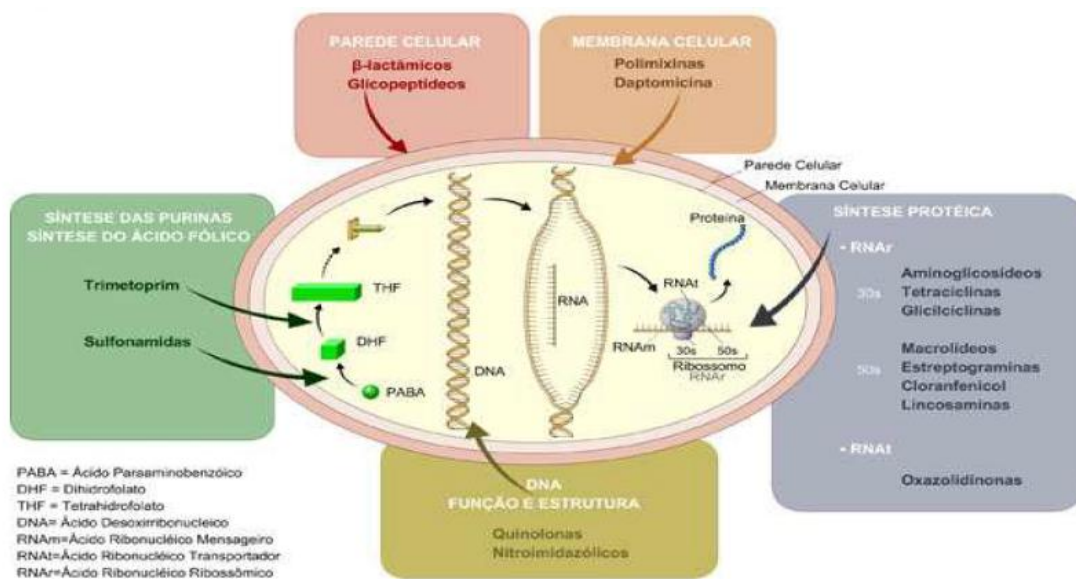
##### 4.1 Terapêutica antimicrobiana

A escolha do antibiótico para o tratamento das doenças infecciosas é um ato complexo, sendo necessário conhecer os mecanismos de ação dos diferentes antibióticos (bactericidas ou bacteriostáticos), os mecanismos de resistência bacteriana, características farmacológicas das moléculas, local e etiologia da infecção, efeitos adversos, incompatibilidade entre medicamentos e história clínica (anamnese) dos doentes, nomeadamente idade, estado funcional renal e hepático (Sousa, 2006).

A escolha do antibiótico é também condicionada pelo local da infecção, pois o fármaco deverá atingir concentrações terapêuticas nesse local. Para o tratamento da ITU deverão ser utilizados antibióticos de eliminação urinária como os  $\beta$ -lactâmicos, glicopeptídeos, fosfomicina, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas, e nitrofurantoína (Tabela 1) (Sousa, 2006, Rolo, *et al.*, 2008). Os grupos de antibióticos utilizados no tratamento de ITU atuam em diferentes estruturas alvo na bactéria, sendo que os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, glicopéptídeos e fosfomicina atuam na inibição da síntese da parede celular, os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica, as sulfonamidas e trimetopim inibem a síntese do ácido fólico e as quinolonas inibem a síntese de DNA (Fig. 4), (Sousa 2006, Barroso, *et al.*, 2014).

**Tabela 1:** Principais grupos de antibióticos no tratamento da ITU (Sousa, 2006).

Antibióticos antiparietais	Fosfomicina β – Lactâmicos Glicopeptídeos
Antibióticos inibidores da síntese proteica	Aminoglicosídeos - aminociclitolis
Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos	Quinolonas
Antibióticos antimetabolitos	Sulfonamidas Trimethoprim
Nitrofuranos	Nitrofurantoína



**Figura 4.** Principais alvos de ação dos antibióticos na bactéria.

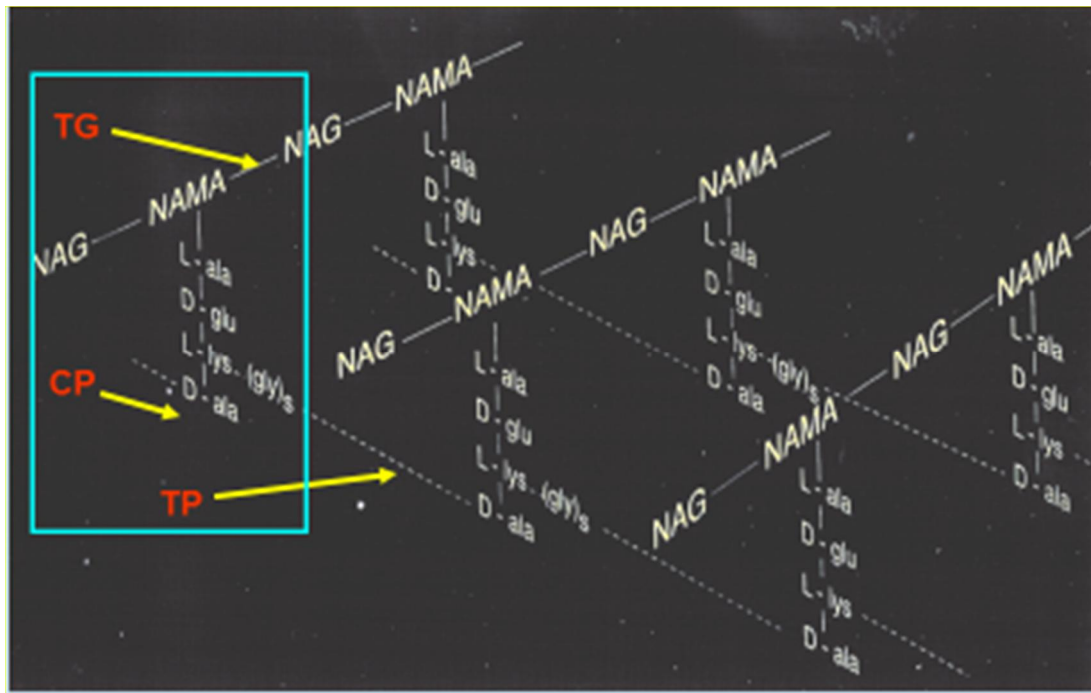
Os antibióticos têm demonstrado uma eficácia inquestionável no tratamento da infecção do trato urinário. Contudo após a sua introdução na prática clínica, rapidamente se verificou que diversos microrganismos adquiriram resistências a antibióticos aos quais inicialmente eram sensíveis. Uma terapêutica antimicrobiana racional é importante de modo a evitar o surgimento das resistências bacterianas responsáveis pelo fracasso terapêutico (Rolo, *et al.*, 2008, Giedraitiene, *et al.*, 2011).

### 4.1.1 Antibióticos antiparietais

A parede celular bacteriana (PC) é a estrutura que reveste externamente a célula bacteriana, anexa à membrana citoplasmática (MC), com grande rigidez, responsável pela forma e integridade da célula e também pelo diferente comportamento das bactérias face à coloração de Gram e condiciona a atividade dos antibióticos. **O mucopeptídeo** ou **peptidoglicano** é a macromolécula exclusiva da PC bacteriana responsável pela sua rigidez, dadas as numerosas ligações químicas intramoleculares, funcionando como um “saco” de revestimento de toda a célula. Os antibióticos antiparietais, inibidores da biossíntese desta macromolécula, fragilizam a PC causando lise celular em ambientes hipotônicos (Sousa 2006).

Independentemente da diferente constituição química da PC das bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, ambas têm em comum o mucopeptídeo, sendo predominante nas bactérias de Gram positivo (70% a 80% do peso seco da PC) e em menor quantidade nas bactérias de Gram negativo (1-5% do peso seco da PC) (Sousa 2006).

O Peptidoglicano é a macromolécula específica da PC bacteriana constituída por cadeias lineares de aminoaçúcares, N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), dispostas alternadamente ao longo das cadeias e unidos por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ , mediadas por transglicolases (TG). Ao NAM estão ligados 4 aminoácidos e são estabelecidas ligações peptídicas (“cross-linking”) entre o 3º aminoácido de uma cadeia glicopeptídea com o 4º aminoácido da cadeia vizinha (Fig.5), mediada por carboxitranspeptidases (CP e TP). Existem diferentes quimiotipos de peptidoglicano consoante as espécies bacterianas. Em *E. coli* esta ligação peptídica ocorre directamente entre dois aminoácidos de cadeias vizinhas (Sousa 2006, Murray, *et al.*, 2005, Normark, *et al.*, 2002).

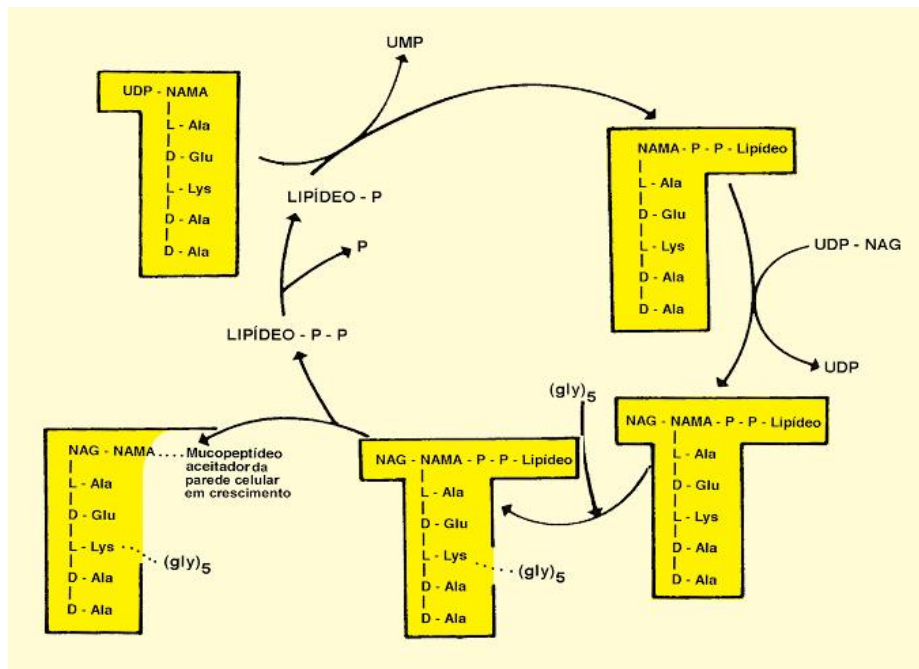


**Figura 5.** Esquema da composição química do peptidoglicano NAG-N-acetilglucosamina ; NAM- ácido N-acetilmurâmico ; L-ala-L-alanina; D-glu-D-glutâmico; L-Lys-L-lisina; D-ala-D-alanina. TG-transglicolase; TP-transpeptidase; CP-transcarboxipeptidase, (imagem cedida pelo Prof. Dr. João C. Sousa).

**Biossíntese do peptidoglicano** é constituída por três fases:

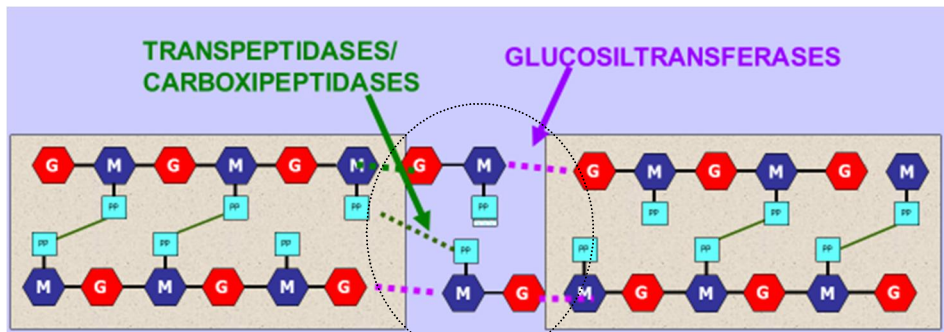
**1ª- Fase citoplasmática** (Fig.6) - síntese de UDP-NAD a partir de Frutose-6-P e a este açúcar adiciona-se enzimaticamente PEP (fosfoenolpiruvato) e três aminoácidos conducentes à síntese de UDP-NAM-tripeptídeo (inibida pelo antibiótico fosfomicina) e no final a adição de D-alanina-D-alanina formando UDP-NAM-pentapeptídeo (inibida pelo antibiótico D-cicloserina). Nesta fase são construídos os “tijolos” para a construção da PC das células em crescimento e em divisão (Sousa,2006);





**Figura 7.** Transporte de UDP-NAM-pentapeptídeo e UDP-NAG através da MC com a formação da subunidade NAG-NAM-pentapeptídeo-P-P-fosfolípido e integração da ponte pentaglicínica (imagem cedida pelo Prof. Dr. João C. Sousa).

**3ª-Fase parietal** (Fig.8) – inicia-se com a incorporação do precursor recém-sintetizado UDP-NAG-NAM-pentapeptídeo-pentaglicina no peptidoglicano pré-formado com ligação à cadeia de aminoácidos, mediada por transglicolases (TG) membranares e com uma ligação peptídica entre o 3º aminoácido e o 4º aminoácido da cadeia vizinha mediada por transpeptidases (TP). A energia requerida para formar estas ligações químicas no exterior celular deriva da hidrólise do dipeptídeo D-alanina-D-alanina mediada por carboxipeptidases (CP) membranares. As enzimas envolvidas na fase terminal da biossíntese do mucopéptido (TG, TP e CP) são globalmente designadas por PBP (Penicillin-Binding-Proteins) e vão ser o alvo dos antibióticos β-lactâmicos (Sousa, 2006).

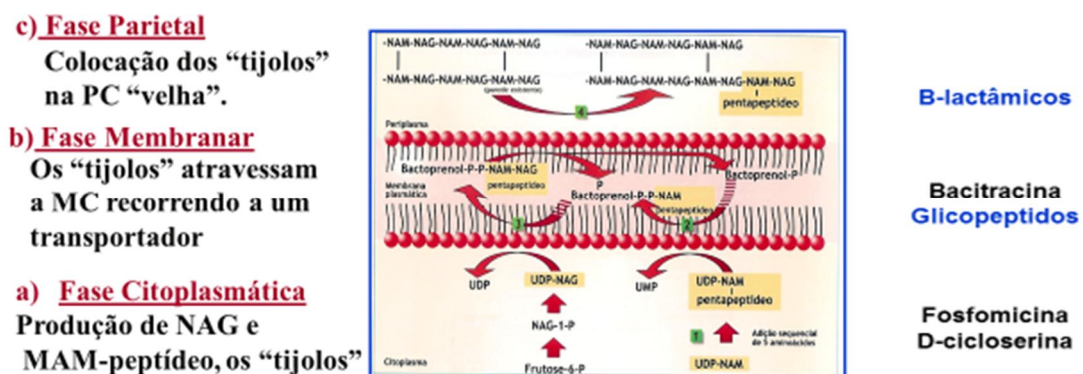


**Figura 8.** Inserção da subunidade UDP-NAG-NAM-pentapeptídeo na PC “velha” com estabelecimento de ligações glicosídicas e peptídicas, mediada por transglicosilases (TG) e carboxitranspeptidases (TP e CP), respectivamente. G-NAM e M-NAM (imagem cedida pelo Prof. Dr. João C. Sousa).

Os  $\beta$ -lactâmicos exercem a sua atividade bactericida em duas fases: inibição da síntese do peptidoglicano (efeito bacteriostático) e indução da autólise bacteriana (efeito bactericida), dado que as autolisinas criam na PC locais frágeis nos quais ocorre a ruptura celular. Estas autolisinas também participam na separação das duas células gêmeas durante a divisão celular (Sousa, 2006).

Os vários antibióticos que pertencem à família dos antiparietais atuam em diferentes fases da biossíntese do peptidoglicano (Fig. 9), (Sousa, 2006).

Esquema da biossíntese do peptidoglicano

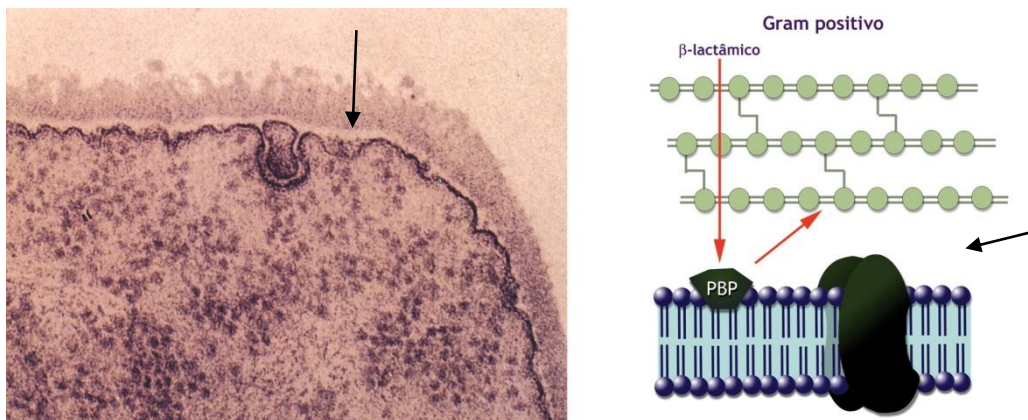


**Figura 9.** Antibióticos ativos nas diferentes fases da biossíntese do peptidoglicano.

A constituição da parede celular das bactérias de Gram positivo é diferente da parede celular das bactérias de Gram negativo, interferindo com a ação das diferentes moléculas desta família de antimicrobianos (Sousa, 2006, Barroso *et al.*, 2014).

### Bactérias de Gram positivo

A ultraestrutura das bactérias de Gram positivo revela que a PC é constituída por uma monocamada justaposta à MC, sendo a célula praticamente desprovida de periplasma (Fig.10). Na maioria dos casos esta PC é permeável a macromoléculas, não oferece resistência à difusão dos antibióticos para o interior da célula bacteriana, assim como substâncias de alto peso molecular elaboradas no citoplasma bacteriano são excretadas para o meio ambiente sem que constitua uma barreira, como é o caso das  $\beta$ -lactamases, enzimas hidrolíticas dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Sousa, 2006, Murray, *et al.*, 2005, Normark, *et al.*, 2002).

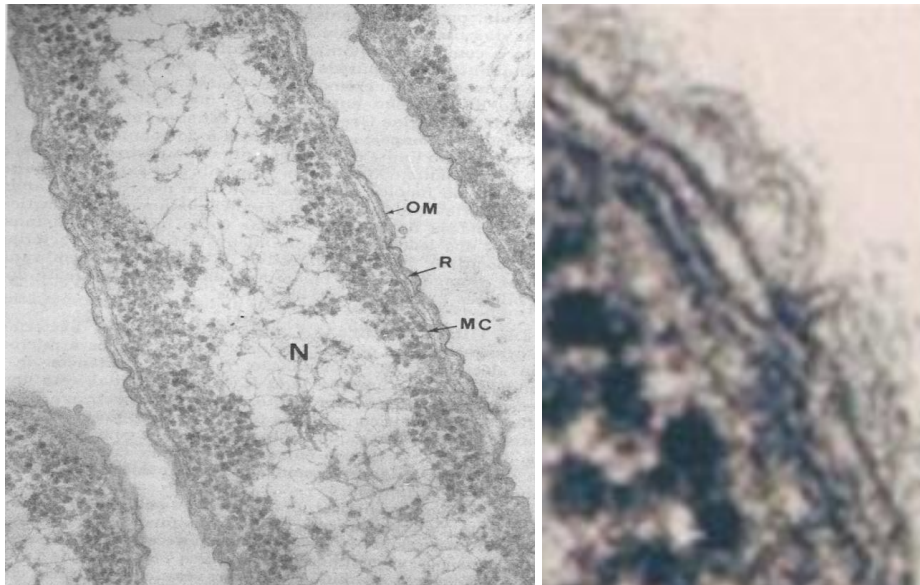


**Figura 10.** PC de bactéria de Gram positivo constituída por uma monocamada espessa, predominantemente constituída por peptidoglicano, justaposta à MC. Notar a reduzida dimensão do periplasma (seta). Esta PC é permeável a antibióticos (à direita). MC-membrana citoplasmática; PC-parede celular (imagem cedida pelo Prof. Dr. João C. Sousa).

### Bactérias de Gram negativo

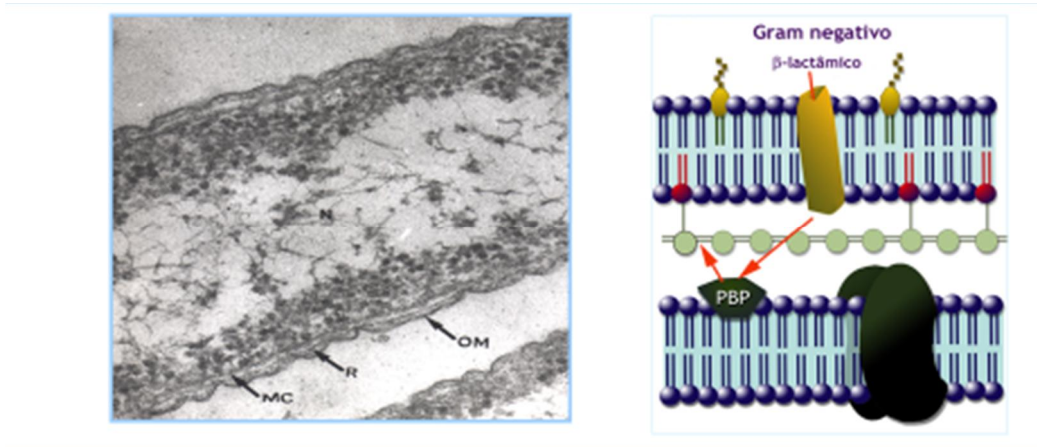
A parede celular das bactérias de Gram negativo é mais complexa que a parede celular das bactérias de Gram positivo quanto à composição química e ultraestrutura.

Com a observação de cortes ultra finos à microscopia electrónica de transmissão (ME), permitiu verificar a existência de 2 camadas na PC destas bactérias (Fig.11): uma camada R (rígida) onde está o peptidoglicano e uma membrana exterior (OM), com um perfil trilaminar assimétrico (o folheto externo mais denso e espesso que o folheto interno). O espaço entre a MC e a OM denomina-se periplasma (Sousa, 2006, Murray, *et al.*, 2005, Normark, *et al.*, 2002).



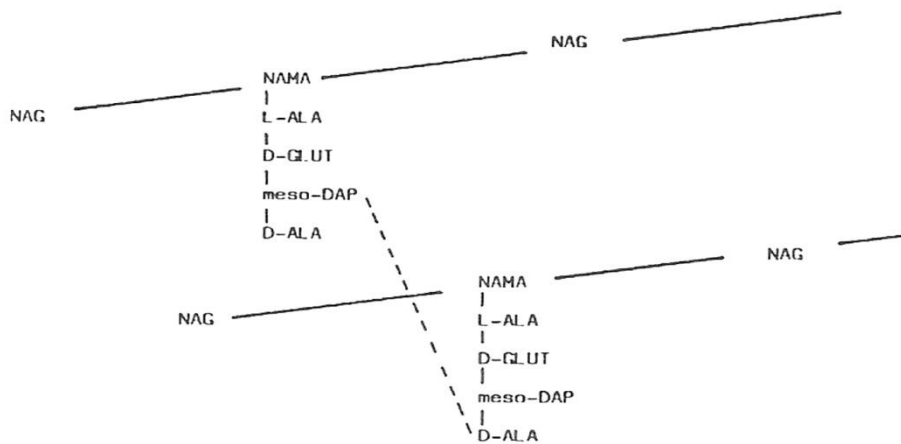
**Figura 11.** Célula de *E.coli* (ME). OM-membrana externa; N-nucleóide; R-camada rígida; MC-membrana citoplasmática. Notar a presença de periplasma entre OM e MC. (Imagem cedida pelo Prof. Dr. João C. Sousa).

A PC das bactérias de Gram negativo é estratificada e a OM é um factor limitante à entrada de nutrientes e antibióticos, podendo ser responsável pela resistência bacteriana a certos antibióticos. Para além disso antibióticos que permeiem a OM predominantemente por difusão através dos canais de porina terão de enfrentar, se existirem, as enzimas degradativas dos antibióticos retidas no periplasma (Fig. 12) (Sousa, 2006).



**Figura 12.** Parede celular Gram negativo, permeabilidade selectiva aos antibióticos, (Imagem cedida pelo Prof. Dr. João C. Sousa).

O peptidoglicano das bactérias de Gram negativo apresenta uma estrutura análoga ao descrito nas bactérias de Gram positivo e de um modo geral apresenta um baixo teor em pontes interpeptídicas. Em *E.coli* as pontes interpeptídicas estabelecem-se directamente entre o grupo –NH<sub>2</sub> do ácido meso-DAP (ácido meso-diaminopimélico) e o grupo –COOH de D-alanina da cadeia peptídica vizinha (Fig.13), (Sousa, 2006; Beveridge, *et al.*, 1999, Murray, *et al.*, 2005, Normark, *et al.*, 2002).



**Figura 13.** Composição química do peptidoglicano de *E.coli* com pontes interpeptídicas a estabelecerem-se directamente entre os aminoácidos meso-DAP de uma cadeia e D-alanina da cadeia vizinha. Meso-DAP-ácido meso-diaminopimélico; L-ALA-L-alanina; D-GLUT-D-ácido glutâmico; D-ALA-D-alanina (imagem cedida pelo Prof. Dr. João C. Sousa).

A **Membrana externa (OM)** funciona como barreira de permeabilidade. É constituída por uma dupla camada lipídica assimétrica, com lipopolissacarídeos (LPS) no folheto externo, fosfolípidos no folheto interno e proteínas porinas (OMPs) que atravessam a OM. A organização da OM pode variar entre grupos bacterianos, sendo este tipo organização existente nas estirpes selvagens de *Enterobacteriaceae*, mas noutros grupos bacterianos podem existir na OM zonas com duplas camadas fosfolipídicas, o que justifica a diferente capacidade de difusão das moléculas de antibióticos em diferentes grupos bacterianos (Sousa, 2006).

A permeabilidade da OM a agentes hidrofóbicos é reduzida dada a interação entre as cadeias de ácidos gordos insaturados do LPS, mediada por catiões divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ), que formam estruturas compactas. A sua reduzida permeabilidade previne o influxo de substratos tóxicos para a bactéria, permitindo a sua sobrevivência em ambientes adversos (Sousa, 2006).

Desta forma, enquanto a PC das bactérias de Gram positivo é permeável a macromoléculas, a PC das bactérias de Gram negativo constitui uma barreira à penetração de compostos de elevado PM, de compostos hidrofóbicos e de compostos com carga eléctrica. Por exemplo, em *E.coli* o limite de exclusão é de aproximadamente 600 Da (Sousa, 2006).

A OM é considerada um fator de virulência das bactérias de Gram negativo, dado que as torna mais resistentes à ação de substâncias que participam na defesa do hospedeiro infectado, tais como lisozima,  $\beta$ -lisinas, proteínas dos leucócitos (leucocidinas), sais biliares (com ação detergente) e enzimas digestivas, normalmente ativas contra bactérias de Gram positivo (Sousa, 2006).

A OM é um obstáculo à penetração de antibióticos constituindo um dos principais mecanismos de resistência natural aos antimicrobianos (Sousa, 2006).

A OM e a MC também estabelecem pontualmente zonas de contacto, zonas de adesão, que podem funcionar como canais de transporte entre o citoplasma bacteriano e

a OM, podendo participar no transporte de fosfolípidos da MC para o folheto externo da OM. Em *E.coli* estimam-se 200-400 zonas de contacto por célula em crescimento (Sousa, 2006).

Os **Lipopolissacarídeos (LPS)** são as moléculas mais características das bactérias de Gram negativo e a principal endotoxina bacteriana. Trata-se de moléculas anfifílicas, com uma região polissacarídica (hidrófila) e com lipídeo A (hidrófoba) (Sousa, 2006).

O LPS tem uma distribuição assimétrica e localiza-se unicamente no folheto externo da OM. Está ancorado na OM através do lipídeo A e a sua região hidrófila projeta-se para o exterior da célula, contribuindo para a carga electronegativa da superfície bacteriana. Catiões divalentes ( $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) estabelecem interações não covalentes entre LPS adjacentes, contribuindo para a estabilidade da OM, tornando-a uma barreira eficaz contra a penetração de antibióticos hidrofóbicos (rifampicina, macrólidos) corantes hidrofóbicos (eosina, azul de metileno e verde brilhante) e detergentes (SDS, sais biliares) normalmente utilizados nos meios de cultura selectivos para *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2006).

As proteínas **Porinas (OMPs-Outer Membrane Proteins)** formam na OM canais aquosos de difusão que permitem o influxo de nutrientes e antibióticos e o efluxo de detritos da célula bacteriana. As porinas são importantes na integridade da OM, no transporte de moléculas, nomeadamente antibióticos e também participam na patogénese das infecções. As porinas estão distribuídas ao longo da OM, em *E.coli* atingem números da ordem de  $1,5 \times 10^5$ / bactéria (Sousa, 2006).

A perda de porinas em algumas estirpes bacterianas está geralmente associada ao aumento de MICs ( Minimal Inhibitory Concentration-  $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos contra essas estirpes, sobretudo quando associados a outros mecanismos de resistência.

Os canais de porina têm uma estrutura trimérica estável, com PM entre 32.000-40.000 Da. Além das porinas triméricas, existem também porinas monoméricas que

permitem uma difusão lenta não específica de pequenos solutos (OmpA de *E.coli* e OprF de *P.aeruginosa*) (Sousa, 2006).

Embora no geral as porinas sejam mais permeáveis a cátions do que a aniões, a permeabilidade das diferentes porinas é diferente. Os antibióticos e os ácidos biliares difundem melhor no canal mais largo de OmpF que no canal OmpC de *E.coli*. Em *Klebsiella pneumoniae* foram descritas porinas homólogas a estas, designadas de OmpK35 (homólogas de OmpF de *E.coli*) e OmpK36 (homólogas de OmpC de *E.coli*). Assim, em bactérias de Gram negativo, as funções de permeabilidade estão distribuídas por dois sistemas membranosos: MC e OM (Sousa, 2006)

**Difusão de antibióticos nos canais de porina e na MC** – em *Enterobacteriaceae*, os fosfolípidos localizam-se em monocamada no folheto interno da OM e os LPS no folheto exterior. O LPS é uma molécula anfifílica, fortemente aniónica e contribuindo para a electronegatividade da superfície bacteriana. Cátions divalentes participam na estabilização desta superfície e impedem que as moléculas hidrófobas permeiem a OM, tornando as bactérias de Gram negativo naturalmente resistentes a antibióticos fortemente ou moderadamente hidrofóbicos (Sousa, 2006).

Os antibióticos atravessam a OM essencialmente por dois processos: **via hidrófila** (através de canais de porinas) e **via hidrófoba** (através de bicamadas fosfolipídicas). Os antibióticos policatiónicos, como os aminoglicosídeos, autopromovem a sua penetração por uma 3ª via (mais rara), designada de “**self-promoted**” (Sousa, 2006).

**1.Via hidrófila** – as proteínas porinas constituem canais aquosos, revestidos internamente por grupos acídicos. O diâmetro, o limite de exclusão e o grau de funcionalidade das porinas variam de bactéria para bactéria. Assim, características como o tamanho das moléculas, o seu grau de hidrofobicidade e a sua carga eléctrica condicionam a sua penetração através dos canais de porina.

Em *Enterobacteriaceae*, os canais de porina são permeáveis a moléculas hidrófilas até ao peso molecular 650 Da (equivalente a um diâmetro de poro de 1,2 nm).

A maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e outros, dado o seu peso molecular, penetram a OM através dos canais de porina. No entanto os antibióticos do grupo dos glicopéptidos como a vancomicina e a teicoplanina, com um peso molecular da ordem dos 1.400 Da não os atravessam, sendo portanto ineficazes contra bactérias de Gram negativo que exibem assim uma resistência natural a estes antibióticos. Os antibióticos glicopéptidos são por isso usados exclusivamente nas infecções por bactérias de Gram positivo.

O **coeficiente de partilha** das moléculas antibióticas (carácter hidrófobo-hidrofílico) e a sua carga eléctrica também influenciam a velocidade de penetração nos canais de porina. Quanto maior for a hidrofobicidade da molécula menor será a sua velocidade de difusão, pelo contrário, antibióticos hidrofílicos (baixo coeficiente de partilha) atravessam rapidamente os canais de porina.

**2.Via hidrófoba** – a penetração de antibióticos fortemente ou moderadamente hidrófobos através da OM não é operacional para as estirpes selvagens de *Enterobacteriaceae*. Em mutantes rugosas profundas, a OM é permeável a esses antibióticos, que não utilizam a via hidrófila, mas difundem através de zonas com bicamadas fosfolípídicas.

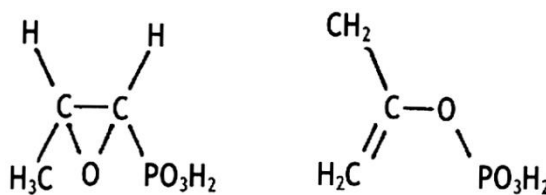
**3.Via “self-promoted”**- polimixinas e aminoglicosídeos são antibióticos policatiónicos e portanto na OM competem com os iões  $Mg^{2+}$  ao nível dos LPS. Este efeito permeabiliza a OM de *P.aeruginosa*, conforme referido anteriormente.

#### **4.1.1.1 Antibióticos antiparietais (fase citoplasmática)**

##### **4.1.1.1.1 Fosfomicina**

A fosfomicina apresenta uma estrutura química análoga ao fosfoenolpiruvato (Fig. 14), produzida por *Streptomyces fradiae*, com espectro de atividade mais ativo contra bactérias de Gram negativo (principalmente contra *E. coli* e outras *Enterobacteriaceae*, incluindo as estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro

alargado) do que contra bactérias de Gram positivo (Falagas, *et al.*, 2008, Falagas *et al.*, 2010, Hendin *et al.*, 1969, Popovic *et al.*, 2010, Sousa 2006).



**Figura 14.** Estrutura química da fosfomicina (à esquerda) e do fosfoenolpiruvato (à direita) (adaptada de Sousa 2006).

**Mecanismo de ação** – a fosfomicina é um antibiótico bacteriolítico, inibidor da biossíntese do peptidoglicano, na fase citoplasmática, atua inibindo competitivamente a enzima piruviltransferase (*gene mraA*), impedindo a ligação de fosfoenolpiruvato (PEP) a UDP-N-acetilglucosamina (NAG) impedido assim a formação de UDP-NAM, bloqueando síntese do peptidoglicano (Sousa 2006, Barroso, *et al.*, 2014). A fosfomicina, devido ao seu baixo PM (peso molecular) e o seu coeficiente de partilha atravessa facilmente a membrana externa das bactérias de Gram negativo e permeia a membrana citoplasmática através de dois sistemas de transporte ativo de nutrientes, as permeases de  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato (*gene glpT*), expresso constitutivamente e hexose-6-fosfato (*gene uhpT*), expresso por indução na presença de glucose-6-fosfato. As estirpes bacterianas sensíveis à fosfomicina metabolizam  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato, as estirpes resistentes não metabolizam este composto (Sousa, 2006, Descourouez, *et al.*, 2013, Popovic *et al.*, 2010, Kahan, *et al.*, 1974).

Nas estirpes de *E.coli* a entrada de fosfomicina é feita predominantemente com a intervenção da permease glicerol-3-fosfato, sendo o sistema de transporte indutível da hexose - 6 - fosfato utilizado como transporte alternativo (Sousa 2006).

**Resistência bacteriana** – as resistências bacterianas à fosfomicina podem ocorrer devido a mecanismos de resistência cromossômicas e/ou resistência plasmídica (Sousa, 2006; Oteo, *et al.*, 2009, Takata, *et al.*, 2010).

**Resistência cromossômica** - deve-se à existência de mutações que afetam o sistema de transporte da fosfomicina, ou seja mutações nos genes *glpT* e *uhpT* que codificam as permeases da fosfomicina impedindo assim que atinja intracelularmente concentrações terapêuticas;

- Mutações nos genes da região promotora das permeases (gene *ptsI*), afetando a sua expressão;

- Mutações no gene *uhpA*, gene que codifica a proteína reguladora para a ativação da transcrição do gene *uhpT*, provocando diminuição da expressão de UhpT;

- Mutações no gene *murA*, gene que codifica a enzima alvo da fosfomicina, alterando assim a piruviltransferase.

**Resistência plasmídica** – deve-se à presença do gene *fosA*, localizado num grande plasmídeo. O gene *fosA* codifica uma enzima que se liga ao C1 da fosfomicina, a transferase da glutatona, formando um complexo fosfomicina-glutaciona desprovido de atividade antibacteriana; outros genes existentes em plasmídeos que originam resistência à fosfomicina são gene *fosB*, gene *fosX*, gene *fosC*.

As resistências à fosfomicina não têm aumentado significativamente ao longo do tempo e não exibem frequentemente resistência cruzada com outros grupos de antibióticos. Em Portugal e na maioria dos países a incidência de resistência de estirpes uropatogénicas de *E. coli* à fosfomicina é baixa (Sousa, 2006; Oteo, *et al.*, 2009, Takata, *et al.*, 2010).

**Uso clínico** – a fosfomicina é um antibiótico, utilizado sob a forma de trometamol de fosfomicina administrado por via oral e apresenta particularmente eficácia no tratamento de infeções do trato urinário (Barroso, *et al.*, 2014). Apresenta uma elevada biodisponibilidade, em que uma dose de 3 gramas permite atingir concentrações na urina muito elevadas 4 horas após a sua administração oral (concentração 350 vezes superior à CMI de *E. coli*), permanecendo a concentração superior a 128mg/L 48 a 72

horas, facilitando assim a eliminação do agente etiológico. O facto de só se necessitar da administração de uma dose única facilita a adesão do doente à antibioterapia e promove menos alterações na flora do trato gastrointestinal e menos efeitos secundários. A atividade antibacteriana da fosfomicina é afectada pela densidade do inóculo bacteriano e diminui também com a subida do pH, o que é importante para o tratamento da infeção urinária (Sousa, 2006, Popovic, *et al.*, 2010, Roussos, *et al.*, 2009, Reeves, 1994).

#### **4.1.1.2 Antibióticos antiparietais (fase membrana)**

##### **4.1.1.2.1 Glicopeptídeos**

Os principais representantes do grupo dos glicopeptídeos são Vancomicina e Teicoplanina, são antibióticos bacteriolíticos, ativos contra bactérias em crescimento, inibidores da biossíntese do peptidoglicano na fase membrana. Este grupo de antibióticos é utilizado no tratamento de ITU originada por bactérias de Gram positivo (Sousa, 2006, Ferreira, 1996).

**Mecanismo de ação** – as moléculas do grupo dos glicopeptídeos formam um complexo com o dipeptídeo D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica dos precursores do peptidoglicano, impedindo a assim a sua formação (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014).

**Resistência bacteriana** - as resistências bacterianas aos glicopeptídeos podem ocorrer devido a mecanismos de resistência intrínseca ou resistência adquirida.

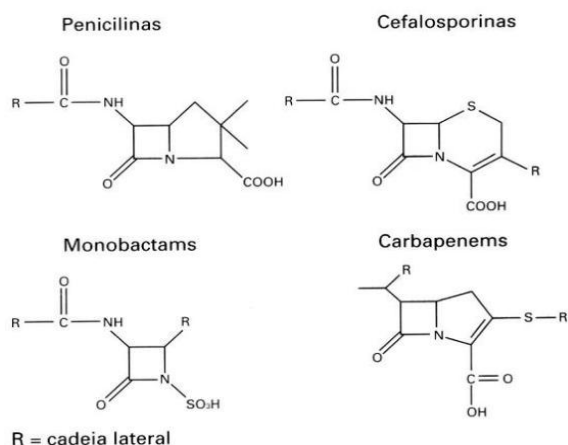
**Resistência intrínseca** – os glicopeptídeos não são ativos contra bactérias de Gram negativo, devido ao elevado peso molecular destas moléculas, o que impede a sua difusão através dos canais de porina presentes na membrana externa da bactéria.

**Resistência adquirida** – a resistência aos glicopeptídeos pode estar associada à presença de enzimas codificadas pelo gene *van*, que codifica alterações nos alvos destas moléculas (Sousa 2006, Ferreira, 1998, Forbes, 2007, Barroso, *et al.*, 2014).

### 4.1.1.3 Antibióticos antiparietais (fase parietal)

#### 4.1.1.3.1 *Beta-lactâmicos*

Os  $\beta$ -lactâmicos representam a maior classe de antibióticos e a mais importante dada a sua eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade. As várias moléculas pertencentes a esta classe encontram-se distribuídas por quatro grupos distintos: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems, que se caracterizam pela presença comum de uma estrutura cíclica, o anel  $\beta$ -lactâmico, constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio (azoto), com radicais substituintes. (Fig. 15) (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Risueño, *et al.*, 2002, Ferreira, *et al.*, 1998). O anel  $\beta$ -lactâmico pode estar isolado como nos monobactams, ou fundido com o anel de tiazolidina nas penicilinas ou associado com um anel di-hidrotiazina nas cefalosporinas. Os carbapenems diferem dos outros  $\beta$ -lactâmicos porque possuem um átomo de carbono (C) no anel anexo ao anel  $\beta$ -lactâmico, em vez de um átomo de enxofre (S) (Fig. 15) (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Ferreira, *et al.*, 1998).



**Figura 15.** Diferentes classes Betalactâmicos (Williams, 1999).

#### **4.1.1.3.1.1 Mecanismo de ação**

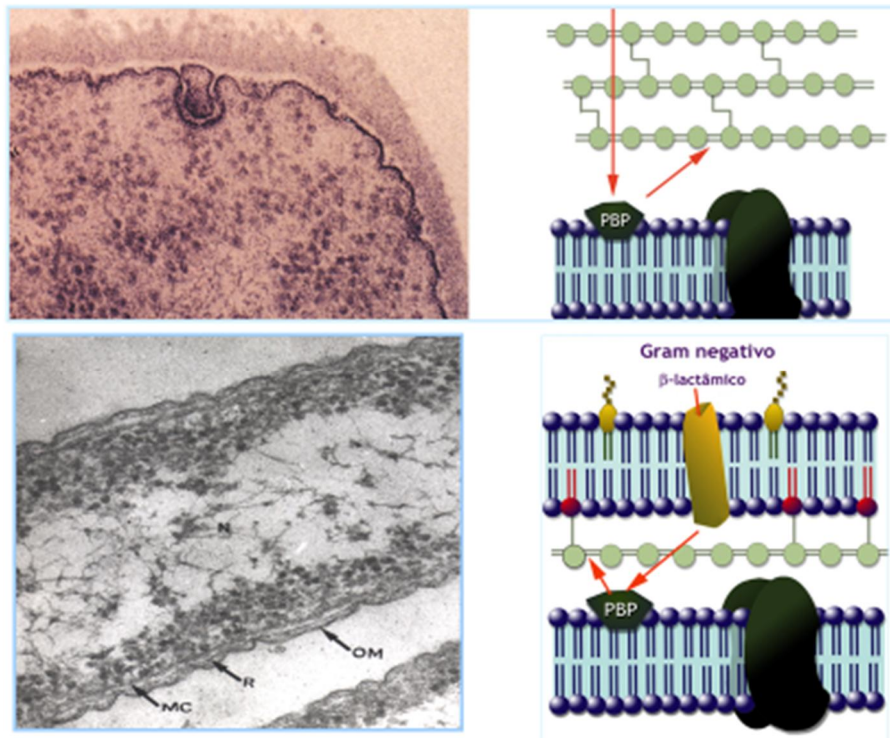
Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibem a fase final da biossíntese do peptidoglicano, ligando-se aos PBPs (*Penicillin-Binding-Proteins*) impedindo assim a síntese do peptidoglicano, ou seja inibe irreversivelmente as D-D-carboxitranspeptidase (CP e TP). Desta forma a síntese da parede celular fica inibida levando a ativação das autolisinas endógenas e subsequentemente a lise celular, justificando assim o perfil bactericida e mesmo bacteriolítico dos  $\beta$ -lactâmicos (Sousa, 2006; Barroso, *et al.*, 2014, Ferreira, 1998, Suarez e Gudiol, 2009). Os  $\beta$ -lactâmicos ligam-se aos PBPs, impedindo a transpeptidação, isto é, inibem o estabelecimento de pontes interpeptídicas, entre as cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano em crescimento. O complexo que se forma entre o anel  $\beta$ -lactâmicos e os PBPs é muito estável, devido a elevada afinidade dos PBPs para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em detrimento do seu alvo natural, D-alanil-D-alanil (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Ferreira, *et al.*, 1998). Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos têm que atravessar a parede celular bacteriana para se ligarem aos PBPs, a permeação da parede celular ocorre por mecanismos diferentes nas bactérias de Gram negativo e de Gram positivo (Fig. 16) (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014, Murray, *et al.*, 2005, Normark, *et al.*, 2002).

Nas bactérias de Gram positivo a parede celular é principalmente constituída por peptidoglicano, conferindo-lhe resistência mecânica. A membrana citoplasmática encontra-se justaposta à parede celular, estando inseridos os PBPs no folheto externo desta estrutura (Fig. 16) (Sousa, 2006, Murray, *et al.*, 2005, Normark, *et al.*, 2002).

Nas bactérias de Gram negativo a parede celular é mais estratificada, sendo constituída por camadas de lipopolissacarídeos e fosfolípidos, onde se inserem os poros constituídos por proteínas (canais de porina), sob as quais se encontra a camada de peptidoglicano. Entre esta última camada e a membrana citoplasmática existe o espaço periplasmático, as PBPs localizam-se no folheto externo da membrana citoplasmática (Fig. 16) (Sousa 2006; Murray, *et al.*, 2005, Normark, *et al.*, 2002).

Os  $\beta$ -lactâmicos são ativos sobre a bactéria que está em fase ativa de crescimento, no entanto quer nas bactérias de Gram positivo quer nas bactérias de Gram

negativo apresentam diferentes espectros de atividade antibacterina devido a diferenças estruturais no peptidoglicano, a constituição dos recetores de membrana, a atividade das autolisinas, a diferente distribuição de PBPs entre as espécies bacterianas e também a outros fatores como a permeabilidade através dos canais de porina e a expulsão por bombas de efluxo (Sousa 2006, Murray, *et al.*, 2005, Normark, *et al.*, 2002).



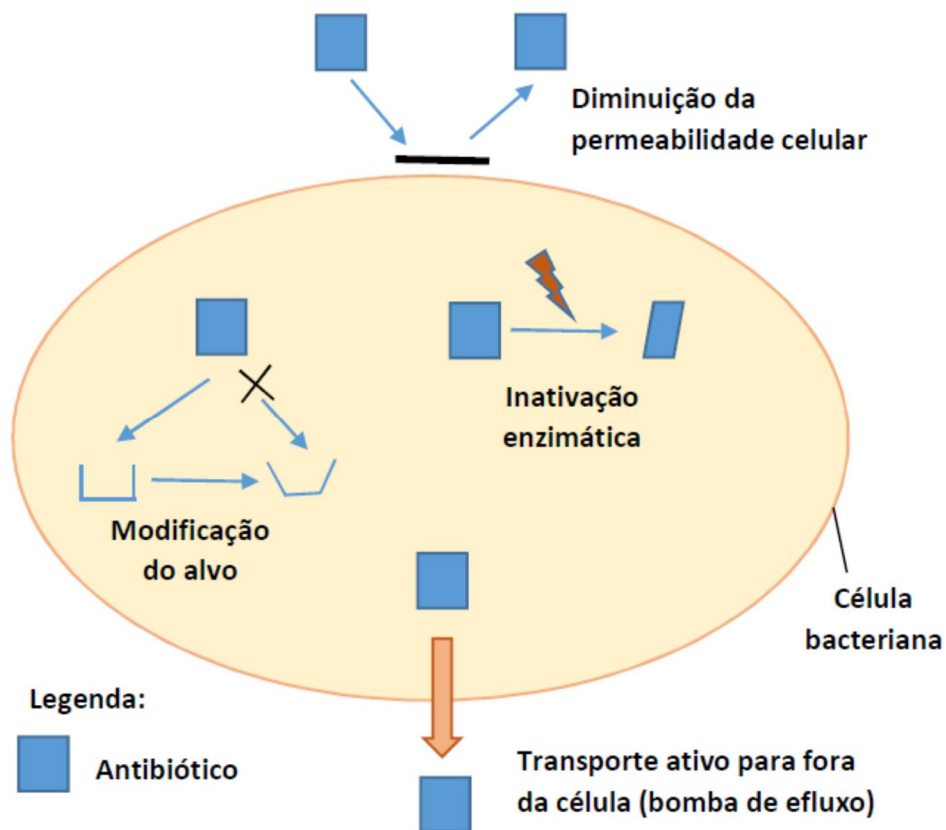
**Figura 16.** Ultraestrutura da PC de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo (à esquerda). À direita esquema da respectiva PC. (Imagem cedida pelo Prof. Dr. João C. Sousa).

#### 4.1.1.3.1.2 Resistência bacteriana

A eficácia da ação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos está constantemente a ser ameaçada pela emergente capacidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência das bactérias a este grupo de antibióticos. As bactérias escapam ao efeito bacteriolítico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pelos seguintes mecanismos (Fig. 17):

- Modificação dos alvos (PBPs),
- Impermeabilização da membrana externa,
- Bombas de efluxo,
- Hidrólise enzimática dos  $\beta$  – lactâmicos por  $\beta$  – lactamases,

Atuação dos vários mecanismos pode ser independente ou simultânea, consoante o património genético adquirido pela bactéria (Poole, 2004, Sousa, 2006, Nikaido, 2009, Risueño, *et al.*, 2002).



**Figura 17.** Mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$  – lactâmicos, adaptado de The Free Dictionary, [img.tfd.com](http://img.tfd.com)

## **A - Modificação dos alvos (PBPs)**

A modificação dos alvos (PBPs) onde o antibiótico se vai ligar, leva a impossibilidade deste exercer a sua ação, tornando a bactéria resistente ao antibiótico. Mutações nos genes que codificam os PBPs, recombinações homólogas entre genes de PBPs ou síntese de novos PBPs sem grande afinidade para os  $\beta$  – lactâmicos, tornam as bactérias resistentes a este grupo de antibióticos (Sousa, 2006, Poole, 2004, Fuda, *et al.*, 2004, Nichol, *et al.*, 2002).

O tipo e o número de PBPs varia de espécie para espécie, sendo um dos principais mecanismo de resistência nas bactérias de Gram positivo, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, enquanto nas bactérias de Gram negativo apresentam pouca relevância (Sousa 2006, Poole, 2004, Fuda, *et al.*, 2004, Nichol, *et al.*, 2002).

O aparecimento da estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é o exemplo mais importante de aquisição de novos alvos (PBPs). O mecanismo que confere a resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina deve-se a aquisição do gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina extra (PBP), a PBP<sub>2a</sub>, com baixa afinidade para todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, excepto com a ceftarolina. O gene *mecA* é transportado por um elemento genético móvel SCCmec (Staphylococcal Chromosome Cassette *mec*) (Sousa, 2006, Lowy, *et al.*, 2008, Barroso, *et al.*, 2014)

As estirpes MRSA surgiram inicialmente a nível hospitalar, HA-MRSA (Hospital Acquired-MRSA) e mais tarde surgiu na comunidade, CA-MRSA (Community Acquired-MRSA), mas expressam algumas características diferentes, tanto a nível do tipo de infeção como o tipo de estirpe. As infeções causadas por MRSA adquiridos na comunidade, CA-MRSA apresentam usualmente uma sintomatologia distinta das infeções causadas por MRSA de origem hospitalar (HA-MRSA), estando principalmente associadas a infeções da pele e dos tecidos moles (celulite, foliculite, fascite, impetigo), as estirpes que causam este tipo de infeção são distintas, contendo um

conjunto de características genéticas que as diferenciam das estirpes de origem hospitalar principalmente o facto de serem resistentes a um número reduzido de antibióticos para além dos  $\beta$ -lactâmicos, serem de linhagens clonais específicas, conterem SCCmec do tipo IV ou V, e conterem fatores de virulência próprios como a PVL (leucocidina panton-valentine) ou o ACME (arginine catabolic mobile arginine) (Sousa, 2006, Lowy, *et al.*, 2008; Barroso, *et al.*, 2014).

As estirpes HÁ-MRSA para além de apresentar uma quase total resistência aos  $\beta$  – lactâmicos apresentam também uma elevada resistência aos vários grupos de antibióticos, constituindo um problema grave de Saúde Pública. No tratamento de infeções é graves causadas por estirpes HA-MRSA ou CA-MRSA em que existe várias resistência a outros grupos de antibióticos uma opção terapêutica ainda eficaz são os glicopéptido, a vancomina e a teicoplanina. Mas têm surgido estirpes com resistentes intermédia à vancomina (VISA – *Saphylococcus aureus* intermédio a vancomicina) e estirpes resistentes à vancomicina (VRSA - *Saphylococcus aureus* resistente a vancomicina), nestas situações há a necessidade de recorrer ao linezolid ou tegiciclina, mas também já foram descritas algumas resistências. A resistência aos glicopeptídeos (a vancomina e à teicoplanina) deve-se a existência do gene *vanA*, que está inserido no transposição *Tn1546* (Barroso, *et al.*, 2014). Surgiu recentemente as cefalosporinas de 5<sup>o</sup> geração, ceftarolina e o ceftobiprola, são ativas contra estas estirpes MRSA e/ou multi-resistentes. Estas cefalosporinas possuem afinidade para todos os PBPs incluindo o PBP2a, permitindo assim exercer a sua atividade antibiótica (Saravolatz, *et al.*, 2011).

## **B - Impermeabilização da membrana externa**

A diminuição de permeabilidade é um dos mecanismos de resistência mais importantes em bactérias de Gram negativo, pois nestas bactérias o fluxo das moléculas para o interior da célula é assegurado pela existência de complexos de proteínas de membrana, OMPs (Outer Membrane Proteins), ou seja pelos canais de porina. A passagem de moléculas, antibióticos para o interior da bactéria é influenciada pela sua carga, estrutura e dimensão (Sousa, 2006, Livermore, 2003).

A diminuição da susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$  – lactâmicos pode ser devido a ausência ou alteração na permeabilidade da membrana externa, por ausência ou expressão diminuída de porinas (Drawz e Bonomo, 2010). Em algumas estirpes bacterianas, a ausência de porinas tem uma relação direta com a resistência aos antibióticos, como é exemplo a perda da porina OprD em *Pseudomonas aeruginosa* provocando resistência aos carbapenems (Sousa 2006, Barroso, *et al.*, 2014, Nikaido 2003). Mutações nas porinas OmpF e OmpC em *E.coli* e a OmpK35 e OmpK37 em *K.pneumoniae* contribuem para a resistência ao ertapenemo, pois são os canais preferenciais para a sua entrada (Barroso, *et al.*, 2014, Sousa, 2006, Kumar et al, 2010, Wu et al 2011, Yan et al 2010).

### **C - Bombas de efluxo**

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras de metabolitos ou fármacos de dentro para o exterior da célula bacteriana impedindo que estes atinjam intracelularmente concentrações terapêuticas (Poole, 2005). Usualmente, são classificadas, tendo em conta as suas características funcionais e relação filogenética (Saier, 2000, Sousa, 2006). A maioria apresenta baixa especificidade de substrato, o que lhes permite transportar uma grande variedade de moléculas que normalmente são codificadas no cromossoma bacteriano, enquanto as bombas de efluxo fármaco-específicas são geralmente codificadas por plasmídeos (Poole, 2005).

### **D - Hidrólise enzimática dos $\beta$ – lactâmicos por $\beta$ – lactamases**

Nas bactérias de Gram negativo a produção de  $\beta$  – lactamases é o mecanismo mais importante de resistência aos antibióticos  $\beta$  – lactâmicos. Estas enzimas plasmídicas ou cromossômicas hidrolisam o anel  $\beta$  – lactâmico impedindo o antibiótico de exercer a sua função, a acilação dos PBPs, dos quais estão estruturalmente relacionados (Poole, 2004, Sousa, 2006, Bush *et al.*, 2010). As  $\beta$  – lactamases são codificadas por genes plasmídicos ou cromossomais *bla*. O número de  $\beta$  – lactamases está em constante alteração, devido ao aparecimento frequente de novas enzimas. Existe

uma base de dados onde são descritas todas as sequências proteicas dos genes *bla* que são encontradas em todo mundo, <http://www.lahey.org/studies/>.

Diferentes famílias de  $\beta$  – lactamases têm sido descritas de acordo com a constituição química do seu local ativo, capacidade hidrolítica sobre os diferentes  $\beta$  – lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenemos) e a sua inativação por inibidores da  $\beta$  – lactamases (por exemplo, ácido clavulânico) (Bush *et al.*, 1995, Bush *et al.*, 2010). Dada a vasta diversidade de  $\beta$  – lactamases bacterianas, foram vários os esquemas propostos com o objetivo de agrupar de uma forma facilmente compreensível e prática, as diferentes  $\beta$  – lactamases que iam sendo descobertas. Os mais consensuais são o esquema funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (1995), (mais recentemente foi feita uma actualização deste esquema por Karen Bush e George Jacoby em 2010 (Bush *et al.*, 2010) e o esquema estrutural de Ambler (1980), ou a combinação de ambos (Bush e Jacoby, 2010). O primeiro baseia-se na sua classificação tendo em conta o substrato preferencial e perfil de inibidores destas enzimas (Tabela 2), o segundo nas diferenças existentes no centro ativo das enzimas e na sua sequência aminoacídica (Tabela 2), classificando as  $\beta$  – lactamases em quatro grandes grupos (A, B, C e D) (Bush *et al.*, 1995). Assim, a classe A de Ambler inclui as  $\beta$  – lactamases que possuem serina no centro ativo. A classe B engloba as metalo – enzimas dependentes de zinco, não inibidas pelo ácido clavulânico. As classe C compreende as  $\beta$  – lactamases do tipo serina que hidrolisam preferencialmente as cefalosporinas, e a classe D inclui as  $\beta$  – lactamases do tipo serina que hidrolisam a oxacilina (Ambler, 1980, Sousa, 2006).

Os esquemas de classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995) e Bush-Jacoby (Bush *et al.*, 2010) classificam as beta-lactamases segundo o esquema funcional dos grupos de Ambler. Esta baseia-se na similaridade funcional (perfil de substrato e de inibição) das enzimas incluídas em cada grupo da classificação de Ambler. Segundo este tipo de classificação, as beta-lactamases são divididas em quatro grupos principais e vários subgrupos, representado na Tabela 2:

**Tabela 2.** Esquema de classificação de beta-lactamases (adaptado de Bush *et al.*, 2010).

Bush- Jacoby (2010)	Bush- Jacoby- Medeiros (1995)	Ambler	Substratos	Inibição por:		Algumas enzimas Representativas
				AC ou TZB <sup>a</sup>	EDTA <sup>b</sup>	
1	1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC de bactérias de Gram negativo; CMY-2; DHA-1
1e	NI <sup>c</sup>	C	Cefalosporinas	-	-	GC1; CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de bactérias de Gram positivo; PC1
2b	2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	+	-	TEM-1; TEM-2; SHV-1
2be	2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas de largo espectro, Monobactamos	+	-	TEM-3 a TEM-178; SHV-2 a SHV-131; <i>K. oxytoca</i> K1; PER-1; VEB-1; CTX-M-1 a CTX-M-93
2br	2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36; TEM-38 a TEM-40; TEM-44; TEM-59; TEM-65; SHV-10
2ber	NI <sup>c</sup>	A	Cefalosporinas de largo espectro, Monobactamos	-	-	TEM-50 (CMT-1)
2c	2c	A	Penicilinas, Carbenicilina	+	-	PSE-1; CARB-3
2ce	NI <sup>c</sup>	A	Carbenicilina, Cefepime	+	-	RTG-4 (CARB-10)
2d	2d	D	Cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-10 (PSE-2)
2de	NI <sup>c</sup>	D	Cefalosporinas de largo espectro	±	-	OXA-11; OXA-15
2df	NI <sup>c</sup>	D	Carbapenemos	±	-	OXA-23; OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de largo espectro	+	-	Cefalosporinas induzidas de <i>Proteus vulgaris</i> ; Cep-A
2f	2f	A	Carbapenemos	±	-	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 de

						<i>Serratia marcescens</i> , KPC-1;, GES-2
3a	3	B (B1)	Carbapenemos	-	+	IMP-1; VIM-1; CcrA
		B (B3)				L1; CAU-1; GOB-1
3b	3	B (B2)	Carbapenemos	-	+	CphA; Sfh-1
NI <sup>c</sup>	4	ND <sup>d</sup>	Penicilinas	-	?	Penicilinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

<sup>a</sup>AC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam; <sup>b</sup>EDTA, ácido etilenodiaminotetracético. <sup>c</sup>NI, não incluído. <sup>d</sup>ND, não determinado.

- Grupo 1 - corresponde ao grupo das cefalosporinases dos bacilos de Gram negativo, que hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos excepto os carbapenemos, e não são inibidas pelo ácido clavulânico. As enzimas deste grupo, caracterizadas a nível molecular, pertencem à classe C de Ambler (beta-lactamases do tipo serina).
- Grupo 2 - inclui diferentes tipos de  $\beta$ -lactamases inibidas pelo ácido clavulânico e que fazem parte da classificação molecular A e D de Ambler. Este grupo compreende uma grande variedade de enzimas que se dispõem em vários subgrupos de acordo com o seu perfil de substratos (penicilinases, cefalosporinases, oxacilinases e carbapenemas). Inclui também as  $\beta$ -Lactamases de Espectro Alargado (ESBLs).
- Grupo 3 - inclui as metalo-enzimas, enzimas que contêm um ião zinco no local ativo e que são capazes de hidrolisar os carbapenemos. Ao contrário de outras carbapenemases incluídas noutros grupos, as metalo-carbapenemases não são inibidas pelos inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam) e não hidrolisam os monobactamos. Fazem parte da classe B de Ambler.
- Grupo 4 - compreende as penicilinases não inibidas pelo ácido clavulânico, as quais são raramente encontradas e a nível molecular estão pouco definidas (Jacoby, *et al.*, 2010).

### **D.1 $\beta$ – lactamases de espectro alargado (ESBLs)**

A produção de ESBLs é o mecanismo de resistência aos  $\beta$  – lactâmicos mais comum nas *Enterobacteriaceae*. A primeira ESBLs identificada numa *Enterobacteriaceae* foi isolada na Alemanha, em 1983, poucos anos após a introdução das cefalosporinas de largo espectro na prática clínica (Drieux, *et al.*, 2008, Giske, *et al.*, 2013). A incidência das ESBLs tem vindo a aumentar em todo mundo, sendo frequentemente descritas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e outras espécies de *Enterobacteriaceae* (Cantón, *et al.*, 2006, Livermore *et al.*, 2007, Cantón *et al.*, 2008).

As ESBLs têm a capacidade de hidrolisar e causar resistência bacteriana às penicilinas, às oximinocefalosporinas (cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, cefepime, ceftiroma) e aztreonamo. Não são ativas contra cefamicinas (cefotetan e cefoxitina), inibidores das  $\beta$  – lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) e carbapenemos (Sousa, 2006, Drieux, L. *et al.*, 2008, Livermore, 2008, Pitout, *et al.*, 2005, Giske, *et al.*, 2013, Cantón, *et al.*, 2006).

Existem várias famílias de ESBLs classificadas em diferentes tipos, de acordo com a sua sequência de aminoácidos e a sua atividade hidrolítica sobre diversos antibióticos, algumas apresentando elevada prevalência mundial sendo as mais frequentes as  $\beta$ -lactamases do grupo TEM, SHV e CTX-M (Cantón *et al.*, 2008, Pitout, *et al.*, 2005, Giske, *et al.*, 2013). Cada vez mais, tem sido detectada a presença simultânea de mais do que um tipo de ESBLs em isolados bacterianos de *Enterobacteriaceae* (Ryoo *et al.*, 2005, Cantón *et al.*, 2008). A nomenclatura, assim como algumas características das ESBLs, encontram-se detalhadas no *site* dedicado às ESBLs, criado por George Jacoby e Karen Bush (<http://www.lahey.org./studies/temtable.htm>).

A produção de ESBLs constitui atualmente um dos mais difundidos e reconhecidos mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, comprometendo assim o

uso deste grupo de antibióticos. (Machado, *et al.*, 2013) Portugal é um dos países europeus com taxa mais elevada de produção de ESBLs tipo TEM, SHV e CTX-M em ambiente hospitalar (Machado, *et al.*, 2013).

Um dos principais fatores responsáveis por esta disseminação é a colonização de indivíduos saudáveis com *Enterobacteriaceae* resistentes aos antibióticos contribuindo assim para uma disseminação destas bactérias tanto a nível hospitalar como na comunidade (Machado, *et al.*, 2013). Outro problema é a existência de *Escherichia coli* com resistências as diversos antibióticos nas fezes de seres humanos saudáveis, já relatada em diversos países. (Machado, *et al.*, 2013).

#### **D.1.1. $\beta$ – lactamases de largo espectro do tipo TEM e SHV**

No início da década de 80 as cefalosporinas de terceira geração e inibidores das  $\beta$  – lactamases foram introduzidos na prática clínica, para combater o aumento da prevalência e disseminação das  $\beta$  – lactamases como as TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Brown, *et al.*, 2010). Mas rapidamente surgiram as primeiras  $\beta$  – lactamases de espectro alargado (ESBL), com capacidade para hidrolisar estes fármacos. A primeira ESBL foi descrita em 1983 na Alemanha e rapidamente se disseminou por todo o mundo. Esta disseminação é devida a expansão clonal de organismos produtores e à transferência horizontal de genes ESBL em plasmídeos. Os plasmídeos responsáveis pela produção das ESBL frequentemente também contém genes que codificam resistência a outras classes de antibióticos. (Brown, *et al.*, 2010, Giske, *et al.*, 2013).

As ESBL do tipo TEM e SHV derivam das  $\beta$  – lactamases TEM-1 e TEM-2 e SHV-1, respectivamente, devido a ocorrência de mutações que alteram a configuração dos aminoácidos em torno do local ativo das  $\beta$  – lactamases, alterando as propriedades catalíticas das enzimas proporcionando maior espectro hidrolítico (Paterson *et al.*, 2005, Brown, *et al.*, 2010, Garcia-Vázquez, E., *et al.*, 2011).

São conhecidas várias ESBL TEM e SHV, que apresentam diferenças na sequência de aminoácidos entre elas e variação no ponto isolétrico. Podem ser consultadas no <http://www.lahely.org./studies/temtable.htm>. (Bradford, 2001).

### D.1.2. $\beta$ – lactamases de largo espectro CTX-M

As  $\beta$  – lactamases CTX-M foram descritas pela primeira vez na Alemanha, no início da década de 90, tornando-se endêmica em alguns países, seguida de rápida disseminação por todo o mundo (Mendonça, *et al.*, 2007, Cantón, *et al.*, 2012).

As enzimas CTX-M podem ser classificadas de acordo com a similaridade da sequência dos aminoácidos, em pelo menos 6 grupos (Fig. 18): CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e KLUC, em que cada grupo difere entre si em 10% ou mais, nas sequências de aminoácidos (D’Andrea, *et al.*, 2013). Além destes 6 grupos existem pelo menos 4 variantes de CTX-M que exibem uma estrutura híbrida (Fig 12), que são, CTX-M-45 (anteriormente denominada de Toho-2) que é híbrida entre a CTX-M-14 e uma proteína de origem desconhecida, a CTX-M-64, CTX-M-123 e a CTX-M-132 que são híbridas da enzima CTX-M-15 com diferentes segmentos da CTX-M-14 (D’Andrea, *et al.*, 2013). A maioria das variantes híbridas foram encontradas nos grupos CTX-M 1 e 9, devido ao facto destes apresentarem uma maior apetência para a formação destas variantes (D’Andrea, *et al.*, 2013).

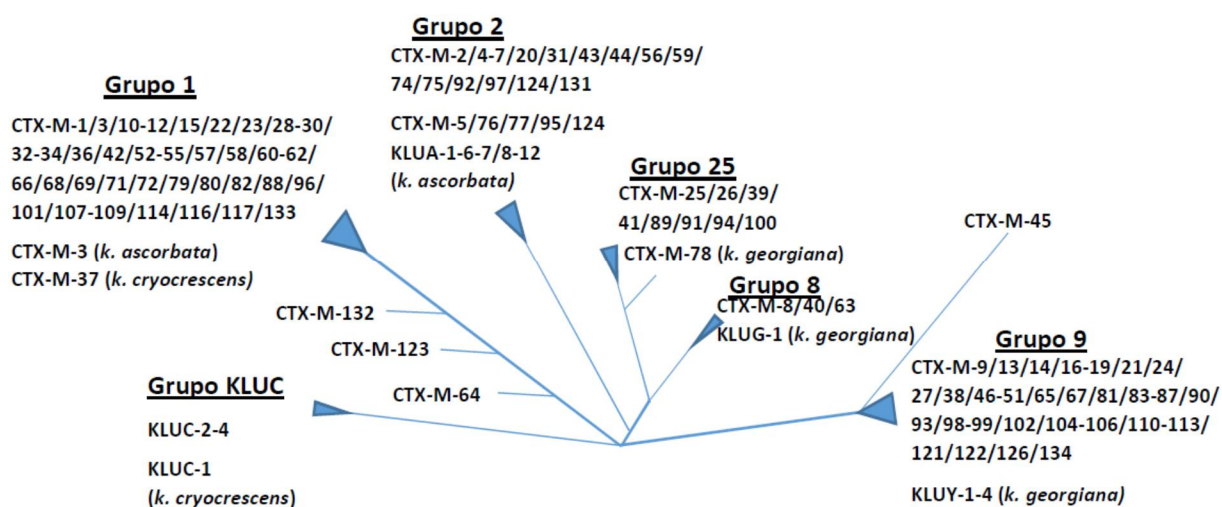


Figura 18. Diagrama dos diferentes grupos CTX-M, D’Andrea, *et al.*, 2013.

Contrariamente a outras  $\beta$  – lactamases adquiridas em que ainda se desconhece a origem, nas  $\beta$  – lactamases tipo CTX-M os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> provêm de algumas espécies do género *Kluyvera*, membro da família das *Enterobacteriaceae*, raramente associada a infecções em humanos (D’Andrea, *et al.*, 2013, Pitout, *et al.*, 2005, Cantón, *et al.*, 2006, Cantón, *et al.*, 2012).

Cada grupo de CTX-M deriva provavelmente de uma ou mais espécies do género *Kluyvera*. Os genes que codificam as variantes CTX-M do grupo 1 e do grupo KLUC foram detectados no cromossoma da espécie *Kluyvera cryocrescens*; os genes que codificam as variantes dos grupos CTX-M 1 e 2 provêm da espécie *Kluyvera ascorbata* e os genes que codificam os grupos CTX-M-8, 9 e 25 provêm da *Kluyvera georgiana* (D’Andrea, *et al.*, 2013, Cantón, *et al.*, 2012).

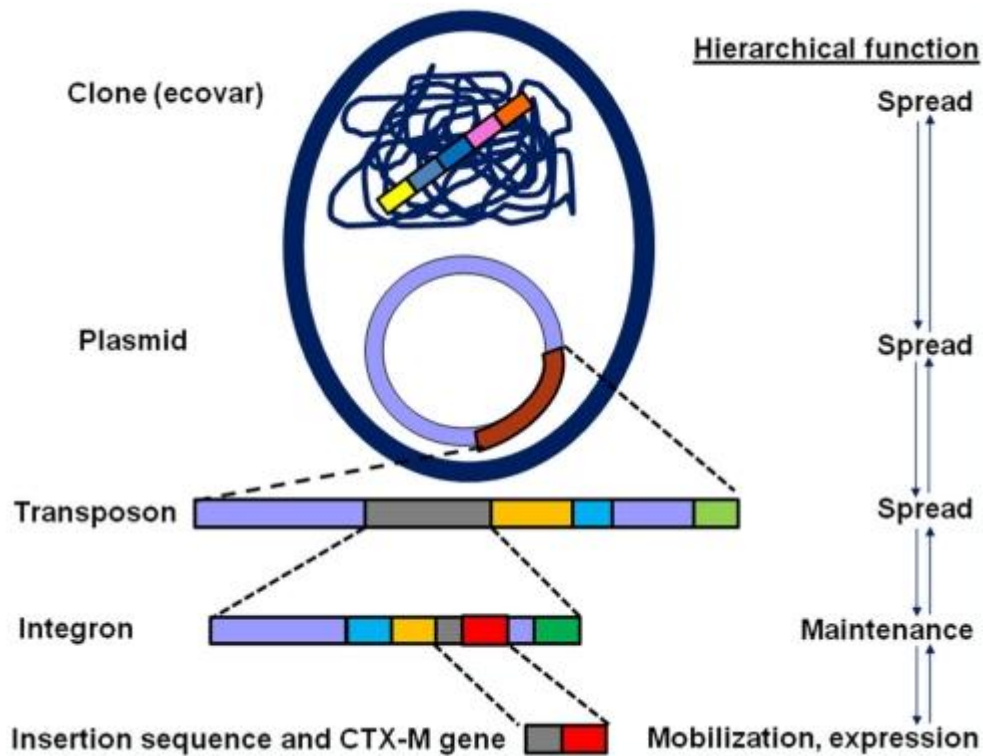
As enzimas CTX-M com estruturas híbridas aparentemente derivam da recombinação entre genes de diferentes grupos ou de diferentes origens que poderão existir simultaneamente no mesmo hospedeiro, favorecendo assim o aparecimento de enzimas híbridas (D’Andrea, *et al.*, 2013, Cantón, *et al.*, 2012).

Na família das *Enterobacteriaceae* os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> adquiridos encontram-se geralmente localizados em plasmídeos transferíveis, embora em algumas espécies principalmente no *Proteus mirabilis*, os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> encontram-se integrados no cromossoma (D’Andrea, *et al.*, 2013).

Tem sido descrito que os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> podem surgir ligados a diferentes elementos genéticos tais como sequências de inserção (IS), integrões e transposões. Estes elementos genéticos poderão ainda estar inseridos em estruturas genéticas mais complexas, como diferentes tipos de plasmídeos, e clones específicos participando na mobilização, difusão e manutenção destes genes (Fig. 19) (Cantón, *et al.*, 2012).

Como descrito anteriormente, os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> têm sido hipoteticamente mobilizados da *Kluyvera spp* pelas IS e em menor percentagem por bacteriófagos. As IS

também participam na supra-expressão destes genes e algumas delas estão adjacentes à estrutura do integrão, que por sua vez podem estar integradas em unidades de transposição. Estas supra estruturas estão normalmente incorporadas dentro de plasmídeos conjugativos, que podem estar presentes em clones de alto risco (Cantón, *et al.*, 2012).



**Figura 19.** Complexidade herárquica do gene *bla* CTX-M, Cantón, *et al.*, 2012.

As IS envolvidas na captura e mobilização dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> também actuam como forte promotor no aumento da expressão destes genes, o que indica que IS localizadas a montante dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> poderão influenciar a selecção e disseminação das enzimas CTX-M (D'Andrea, *et al.*, 2013, Cantón, *et al.*, 2012).

As diferentes IS que têm sido identificadas a montante dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> são a ISEcp1, ISCR1, IS10 e IS26. A ISEcp1 é IS associada a todos os grupos CTX-M excepto ao grupo CTX-M-8, mas ISCR1 é muitas vezes associada a alguns membros dos grupos *bla*<sub>CTX-M-2</sub> e *bla*<sub>CTX-M-9</sub>; ao passo que o IS10 está mais relacionada com o

*bla*<sub>CTX-M-8</sub>. No entanto poderá existir outras IS relacionadas com gene *bla*<sub>CTX-M</sub> cujas suas sequências ainda não são conhecidas (D'Andrea, *et al.*, 2013, Cantón, *et al.*, 2012).

Alguns elementos genéticos e plasmídeos que contém os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> também poderão conter outros genes de resistência, incluindo os genes que codificam as  $\beta$  – lactamases AmpC, carbapenemases, genes de resistência mediada por plasmídeos as quinolonas (genes *qnr*) ou metilases que afetam os aminoglicosídeos (Cantón, *et al.*, 2012).

### **D.1. 3. $\beta$ – lactamases de largo espectro do tipo OXA**

As  $\beta$  – lactamases do tipo OXA são uma das famílias crescentes de ESBLs, pertencentes a classe D, segundo a classificação molecular de Ambler e ao grupo 2d segundo a classificação de Bush (Badford, 2001; Poirel *et al.*, 2010; Evans, *et al.*, 2014).

As  $\beta$  – lactamases do tipo OXA conferem resistência á ampicilina, a cefalotina e caracterizam-se pela elevada atividade hidrolítica contra a oxacilina e cloxacilina e são fracamente inibidas pelo inibidores das  $\beta$  – lactamases (ácido clavulâmico, tazobactam e sulbactam) (Badford, 2001; Poirel *et al.*, 2010).

As enzimas OXA caracterizam-se por uma importante diversidade genética e uma grande heterogeneidade relativamente ao espectro de hidrólise dos betalactâmicos. Fazem parte desta classe, enzimas OXA adquiridas de espectro estrito e enzimas de espectro alargado, incluindo os carbapenemos, justificando o facto de algumas enzimas OXA (por exemplo grupo OXA-48) serem classificadas como carbapenemases. As  $\beta$  – lactamases do tipo OXA adquiridas estão normalmente associados a integrões de classe 1, sequências de inserção e transposões (Poirel *et al.*, 2010).

## **D.2. $\beta$ – lactamases do tipo AmpC**

As  $\beta$  – lactamases do tipo AmpC são enzimas que hidrolisam preferencialmente as cefalosporinas e não são inibidas pelos inibidores das  $\beta$  – lactamases, permitindo assim a sua classificação na classe C de Ambler e no grupo 1 da classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros. Estas enzimas são produzidas por genes com localização cromossômica ou plasmídica (Jacoby, G., 2009, Navarro, *et al.*, 2010).

### **D.2.1. $\beta$ – lactamases AmpC de localização cromossômica**

As  $\beta$  – lactamases AmpC cromossômicas são muito frequentes na família *Enterobacteriaceae*, mas também poderão existir noutras famílias bacterianas. (Jacoby, G., 2009). Na maioria das espécies de *Enterobacteriaceae* a expressão basal é baixa, mas indutível a quando da presença de antibióticos  $\beta$  – lactâmicos, como a aminopenicilinas, cefalosporinas de primeira geração e cefamicinas (cefotitina e cefotetan), sendo rapidamente inativados. Estas estirpes caracterizam-se pela resistência à cefotitina (Kaneko, *et al*, 2005, Merilis, *et al.*, 2006). A cefotitina e o imipenem são fortes indutores de  $\beta$  – lactamases AmpC, por isso não deverão ser associados a outros  $\beta$  – lactâmicos na terapêutica pois a associação é antagónica (Navarro, *et al.*, 2010, Sousa, 2006).

O mecanismo de indução é complexo, baseando-se na paragem da síntese do peptidoglicano, aquando a presença dos antibióticos  $\beta$  – lactâmicos, levando a uma acumulação excessiva de 1,6-anidromuropéptidos (1,6-AMP) no espaço periplasmático. Os 1,6-AMP são transportados para o citoplasma, por uma permease transmembranar (AmpG) em que o excesso liga-se a AmpR, repressor que bloqueia a transcrição do gene *bla* AmpC, ocorrendo assim aumento da transcrição, isto porque o gene deixa de sofrer a influência do repressor (Petrosino *et al.*, 2002, Jacoby, 2009).

Em condições normais os 1,6-AMP que chegam ao citoplasma são convertidos em UDP-N-ácido murânico-pentapeptídeo (UDP-NacMur) pela ação do AmpD (amidase N-acetilamidromuramila-L-alanina), este composto bloqueia a transcrição de *bla*<sub>AmpC</sub> através da ligação ao AmpR e também é necessário para síntese da parede celular (Kaneko *et al.*, 2005, Jacoby, 2009, Petrosino, *et al.*, 2002).

Existem estirpes desreprimidas ou seja expressam constitutivamente altos níveis de  $\beta$  – lactamases AmpC, independentemente da presença ou ausência de indutor. Esta situação deve-se principalmente a mutações no gene AmpD (Jacoby, 2009, Kaneko *et al.*, 2005, Petrosino, *et al.*, 2002).

Na *Escherichia coli* a expressão de  $\beta$  – lactamases AmpC cromossômica é muito baixa e não é indutível, devido à ausência do gene AmpR (Sousa, 2006). No entanto surgem mutantes desreprimidos na produção de AmpC, devido a mutações no gene promotor ou no gene atenuador (Sousa, 2006, Jacoby, 2009, Petrosino, *et al.*, 2002).

Mais recentemente tem sido descrito um novo mecanismo de resistência aos antibióticos  $\beta$  – lactâmicos devido à produção de  $\beta$  – lactamases AmpC de amplo espectro (ESAC), que confere susceptibilidade reduzida a todas as cefalosporinas incluindo a cefepime e cefpiroma, que habitualmente não são afetadas pelas enzimas do tipo AmpC. As ESAC foram descritas em *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Navarro, *et al.*, 2010).

Existem espécies bacterianas em que o gene *bla*<sub>AmpC</sub> está naturalmente ausente, contudo nessas espécies o gene *bla*<sub>AmpC</sub> tem sido encontrado em plasmídeos, designando-se assim  $\beta$  – lactamases AmpC adquiridas ou transferíveis (qAmpC) (Jacoby, 2009).

### D.2.2. $\beta$ – lactamases do tipo **AmpC** plasmídicas (qAmpC)

As  $\beta$  – lactamases AmpC mediadas por plasmídeos foram descritas pela primeira vez em 1989 num isolado de *Klebsiella pneumoniae* proveniente da Coreia do Sul, mas têm vindo a ser encontradas em todo o mundo em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* sobretudo em *E.coli* e *K. pneumoniae* (Jacoby, 2009, Philippon, *et al.*, 2002).

As pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos têm originado diferentes tipos de qAmpC, descritas no site <http://lahely.org/studies/>: CMY, FOX, MOX, DHA, ACC, LTA, MIR, ACT e CFE. Devido a esta elevada diversidade as qAmpC são geralmente classificadas em cinco grupos ou famílias, consoante a semelhança a AmpC cromossómicas das espécies progenitoras, como é evidenciado na Tabela 3 (Jacoby, 2009, Philippon, *et al.*, 2002).

As  $\beta$  – lactamases AmpC mediadas por plasmídeos conferem à bactéria um amplo espectro de resistência aos  $\beta$  – lactâmicos, hidrolisam penicilinas, oximinocefalosporinas e cefamicinas (cefotetina e cefotetan), não são inativadas pelos inibidores das  $\beta$  – lactamases, e a atividade sobre o aztreonam é variável. A atividade das cefalosporinas de quarta geração poderá ser afectada, sendo apenas os carbapenemos estáveis às qAmpC, mas contudo é de salientar que existem algumas excepções dentro dos vários tipos de qAmpC (Jacoby, 2009).

As qAmpC apresentam ponto isoeléctrico (pI) que varia entre 6.4 a 9.4 e um peso molecular que varia entre 38-42 KDa (Philippon, *et al.*, 2002).

Dos diversos grupos de qAmpC descritos o grupo CMY-2 é o que apresenta maior número de variantes descritas, sendo que a enzima CMY-2 a que apresenta maior prevalência e distribuição mundial, tendo uma maior associação a algumas espécies como a *E.coli*. e *Salmonella spp* (Jacoby, 2009, Philippon, *et al.*, 2002).

**Tabela 3.** Origem dos diferentes tipos de enzimas qAmpC (adaptado de Jacoby, 2009)

Origem	Tipo qAmpC	País de origem	Ano
<i>Aeromonas spp</i>	CMY-1	Coreia do Sul	1989
	MOX	Japão	1993
	FOX	Argentina	1994
<i>Citrobacter freundii</i>	CMY-2	Grécia	1996
	LAT	Grécia	1993
	CFE	Japão	2004
<i>Enterobacter spp.</i>	ACT	EUA	1997
	MIR	EUA	1990
<i>Morganella morgani</i>	DHA	Arábia Saudita	1997
<i>Hafnia alvei</i>	ACC	Alemanha	1999

Os plasmídeos portadores dos genes *bla*<sub>AmpC</sub> por vezes também transportam outros genes de resistência a vários antibióticos como aos aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim, assim como genes para outras  $\beta$  – lactamases como TEM, SHV, CTX-M, VIM e PSE (Jacoby, 2009).

O gene AmpC normalmente faz parte de um integron, mas não é incorporado em cassetes de genes e é de salientar que o mesmo gene AmpC poderá ser incorporado em diferentes plasmídeos (Jacoby, 2009).

Uma variedade de elementos genéticos tem sido implicada na mobilização de genes AmpC em plasmídeos. A sequência de inserção ISEcp1 associada a algumas  $\beta$  –

lactamases do tipo CMY e ACC. A ISEcp1 desempenha um duplo papel estando envolvida na transposição de genes adjacentes e na mobilização dos genes do cromossoma *bla* em plasmídeos e também pode fornecer um promotor eficiente para uma expressão de alto nível de genes “vizinhos”. (Jacoby 2009) Existem outros genes *bla*<sub>AmpC</sub> que se encontram adjacentes a sequências de inserção como ISCR1 envolvidos na mobilização de genes integrões de classe 1 (Jacobs, 2009).

### **D.3. Carbapenemases**

Carbapenemases são uma das famílias mais versáteis de  $\beta$  – lactamases, são enzimas capazes de hidrolisar a grande maioria dos antibióticos  $\beta$  – lactâmicos, incluindo os carbapenemos e os inibidores das  $\beta$  – lactamases (Bush, *et al.*, 1995, Nordmann, *et al.*, 2012, Queenan, *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2012).

O surgimento em todo mundo de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos, representam um importante problema de saúde pública, porque como sendo os carbapenemos um grupo de antibióticos com amplo espectro de atividade e de última escolha, resta poucas alternativas para o tratamento de infecções causadas por agentes produtores destes mecanismos de resistência (Nordmann, *et al.*, 2012; Queenan, *et al.*, 2007).

A resistência aos carbapenemos pode surgir por 2 mecanismos distintos:

- (1) Diminuição na absorção do antibiótico devido a alteração qualitativa e/ou quantitativa da expressão de canais de porina em associação com a superexpressão de  $\beta$  – lactamases;
- (2) Aquisição de genes que originam enzimas que degradam os carbapenemos (Nordmann, *et al.*, 2012).

## 1- Resistência aos carbapenemos não mediada por carbapenemases nas *Enterobacteriaceae*.

Os canais de porina, existentes na membrana externa das bactérias permitem a absorção de nutrientes e outros componentes incluindo a passagem de antibióticos. Quando existe alteração quer por mutações ou perda da expressão de porinas ou alteração do tipo de porina poderá diminuir a sensibilidade ao antibiótico.

A resistência aos carbapenemos foi observada pela primeira vez em *Enterobacteriaceae*, especialmente no *Enterobacter spp* devido ao aumento da expressão de AmpC cromossômica e simultaneamente alteração nas porinas OmpC ou OmpF. Este mecanismo de resistência foi também observado em espécie que não expressavam intrinsecamente uma cefalosporinase, mas sim possuíam plasmídeo. Deste modo, a susceptibilidade diminuída aos carbapenemos nas *Enterobacteriaceae* poderá ser causada por enzimas ESBLs ou enzimas AmpC combinada com a diminuição da permeabilidade da membrana externa devido à alteração nos canais de porina (Giske, *et al.*, 2013, Nordmann, *et al.*, 2012).

## 2- Resistência aos carbapenemos mediada por carbapenemases

As carbapenemases são distribuídas pelas diferentes classes moleculares de Ambler, dependendo da composição do seu centro ativo e das suas propriedades hidrolíticas sobre os  $\beta$  – lactâmicos e inibidores das  $\beta$  – lactâmases sendo distribuídas pelas classes A, D e B (metalo-betalactamases). Na classificação funcional de Bush as carbapenemases pertencem ao grupo 2 e 3 (metalo-betalactamases) (Bush *et al.*, 1995, Bush *et al.*, 2010; Nordmann, *et al.*, 2012).

- Carbapenemases Classe A (grupo funcional 2f de Bush et al., 1995)

As três principais famílias de carbapenemases pertencentes a este grupo são as enzimas NmcA/IMI, SME e KPC, caracterizam-se por hidrolisarem as penicilinas,

cefalosporinas, carbapenemos e o aztreonam através de um mecanismo hidrolítico na posição 70 no centro ativo de serina. Esta atividade hidrolítica é inibida pelo ácido clavulânico e tazobactan (inibidores das  $\beta$  – lactâmases) (Nordmann, *et al.*, 2012; Queenan, *et al.*, 2007).

A enzima GES, quarto tipo de enzima deste grupo, inicialmente considerada uma enzima ESBLs porque não possuíam atividade sobre os carbapenemos, mas ao longo do tempo foram surgindo variantes com atividade significativa sobre os carbapenemos (Nordmann, *et al.*, 2012; Queenan, *et al.*, 2007).

As enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) são as mais significativas das carbapenemases da classe A, detectadas inicialmente nos E.U.A, mas rapidamente se disseminaram por todo o mundo. Os genes  $bla_{KPC}$  estão sempre associados a um elemento genético, o transposão *Tn4401*, o que explica a rápida disseminação por todo o mundo (Nordmann, *et al.*, 2012).

- Carbapenemases Classe B (grupo funcional 3 de Bush et al., 1995) - metalo-betalactamases (MBL).

As carbapenemases da classe B, exibem um amplo espectro de atividade hidrolítica, incluindo todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos com a exceção do aztreonam, não são inibidas pelos inibidores das  $\beta$  – lactâmases (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam). O seu mecanismo de hidrólise é dependente da interação do  $\beta$  – lactâmico com iões zinco no centro ativo da enzima, razão que explica o facto de estas enzimas sofrer a inibição da sua atividade pelo EDTA (quelante do ião zinco) (Nordmann, *et al.*, 2012; Queenan, *et al.*, 2007; Bush *et al.*, 2010).

Nas *Enterobacteriaceae* os tipos mais comuns MBL adquiridas são as enzimas tipo IMP, VIM, NDM e mais raramente o tipo KHM. Os genes  $bla_{IMP}$  e  $bla_{VIM}$  encontram-se amplamente disseminados em genes cromossómicos ou associados a

elementos genéticos móveis em cassetes de genes, em integrões, plasmídeos e transposões (Nordmann, *et al.*, 2012).

- Carbapenemases Classe D (grupo 2df de Bush, *et al.*, 1995).

A primeira  $\beta$  – lactâmases OXA com atividade hidrolítica sobre os carbapenemos foi descrita em 1993 no *Acinetobacter baumani*, atualmente denominada OXA-23. Tendo surgido outros tipos como a OXA-24, OXA-48 e a OXA-58 também frequentes no *Acinetobacter baumani*, e a OXA-48 em *Klebsiella pneumoniae* e *E.coli* (Grundmann, *et al.*, 2010, Mirigou, *et al.*, 2010). Estas enzimas hidrolisam os carbapenemos, e não são inibidas pelos inibidores das  $\beta$  – lactâmases (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam). (Poirel *et al.*, 2012, Nordmann, *et al.*, 2012). As  $\beta$  – lactâmases OXA-48 foram identificadas na Turquia em 2001 num surto de *Klebsiella pneumoniae* e desde então tem surgido em todo o mundo (Poirel *et al.*, 2012, Nordmann, *et al.*, 2012)

#### **4.1.1.4 Co-resistências aos diferentes antibióticos**

Os perfis de multiresistência das estirpes produtoras de ESBL que albergam genes de resistência aos  $\beta$  – lactâmicos e a diferentes famílias de antibióticos como as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, trimetopim e sulfonamidas, contribuem para a selecção e persistência destas estirpes tanto em ambiente hospitalar como na comunidade (Corniglia *et al.*, 2008, Coque *et al.*, 2008).

Com os vários estudos que têm sido desenvolvidos, tem-se verificado que a multiresistência está relacionada com o facto dos genes que codificam para a resistência a antibióticos não  $\beta$  – lactâmicos existirem no mesmo elemento genético móvel (plasmídeo, transposição) que contém os genes *bla*<sub>ESBL</sub> (Cantón *et al.*, 2003, Coque *et al.*, 2008). Por exemplo, genes que codificam para ESBLs específicas (*bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, entre outras) encontram-se frequentemente em integrões de localização plasmídica, juntamente com cassetes de genes responsáveis pela resistência

a aminoglicosídeos (*aadA*, *aadB*, *aacA*, *strA*, *armA*), trimetoprim (*dfr*), cloranfenicol (*cml*, *cat*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), e mesmo a outros  $\beta$ -lactâmicos (*bla<sub>OXA</sub>*). A presença de genes *bla<sub>ESBL</sub>* específicos tem sido também descrita em transposões (por exemplo, *bla<sub>CTX-M-9</sub>* e *bla<sub>TEM-24</sub>* em *Tn21*) (Novais *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2010).

Tem-se verificado o aumento da resistência às quinolonas, mediada por plasmídeos, em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, sobretudo em *K. pneumoniae* e *E. coli* (Cantón *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008). Esta diminuição da atividade das quinolonas pode estar relacionada com a produção de proteínas *Qnr*, codificada por genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ou *qnrS*, estas proteínas interagem com a girase e topoisomerase IV do DNA, impedindo a ligação da quinolona ao alvo (Robicsek *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2009). Estes genes na sua maioria, encontram-se associados a enzimas dos grupos CTX-M-9 ou CTX-M-1, reflectindo o facto de que genes que codificam para a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas estão frequentemente localizados no mesmo plasmídeo (Jones *et al.*, 2008); a produção de *acetilases* que podem afectar a atividade de certas fluoroquinolonas, como é o caso de AAC(6')-Ib-cr, codificada pelo gene *aac(6')-Ib-cr*, muito associado a isolados produtores de ESBLs do tipo CTX-M-15, esta enzima tem atividade sobre a ciprofloxacina e a norfloxacina, inativando também aminoglicosídeos (Robicsek *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2006); a aquisição de genes que codificam para *sistemas de efluxo* de fluoroquinolonas (*qepA*, *oqxAB*), os transportadores de membrana envolvidos nestes sistemas de exportação ativa, podem ser específicos de uma classe de antibióticos ou responsáveis pela resistência a múltiplos fármacos (Strahilevitz *et al.*, 2009; Coque *et al.*, 2008).

#### **4.1.1.5. Epidemiologia das resistências bacterianas**

A epidemiologia das ESBLs é muito complexa devido aos diversos fatores envolvidos na rápida disseminação deste tipo de bactérias produtoras de ESBLs e /ou de genes *bla<sub>ESBL</sub>*. São exemplo disso, o aumento do uso de antibióticos tanto em humanos como em animais, a existência de infecções cruzadas a nível hospitalar, a mobilização de pacientes entre instituições de saúde, a cadeia alimentar, a migração humana e a crescente industrialização (Coque *et al.*, 2008, Hawkey *et al.*, 2009).

As primeiras estirpes produtoras de ESBLs foram identificadas em 1983 e desde então, têm sido observadas em todo o mundo. Esta distribuição deve-se à expansão clonal das bactérias produtoras, à transferência horizontal de genes ESBLs em plasmídeos e à existência de diferentes genes de resistência em elementos transferíveis como plasmídeos, transposões, integrões ou estruturas genéticas (Giske, *et al.*, 2013, Machado, *et al.*, 2005).

Na década de 1990 foram descritas principalmente enzimas do tipo TEM e SHV em *Klebsiella pneumoniae*, sendo sobretudo responsáveis por surtos nosocomiais, especialmente em unidades de cuidados intensivos (Cantón, *et al.*, 2008). Posteriormente estas  $\beta$  – lactamases foram também encontradas na *Escherichia coli* em infecções adquiridas na comunidade (Coque, *et al.*, 2008). Durante a última década no entanto, estas enzimas têm sido amplamente substituídas pelas enzimas tipo CTX-M. Estas ESBLs são mais comuns na *E.coli* encontradas predominantemente na comunidade e por vezes em pacientes com infecções do trato urinário (Pitout, *et al.*, 2005, ECDC, 2013, Cantón, *et al.*, 2008).

Outras enzimas que foram surgindo e que afetam a susceptibilidade às cefalosporinas de 3ª geração (nomeadamente às cefamicinas), são as  $\beta$  – lactamases do tipo qAmpC. A CMY-2 é a enzima mais comum pertencente a este grupo, sendo mais frequente nos Estados Unidos do que na Europa (ECDC, 2013).

O aparecimento de resistência aos carbapenemos em *E. coli*, mediada por metalo-betalactamases, como as enzimas VIM, IMP ou NDM; ou serino-carbapenemases como a enzima KPC, irá ser uma ameaça importante e exigirá vigilância num futuro próximo. Estas enzimas podem proporcionar resistência à maioria ou a todos os  $\beta$ -lactâmicos existente (ECDC, 2013).

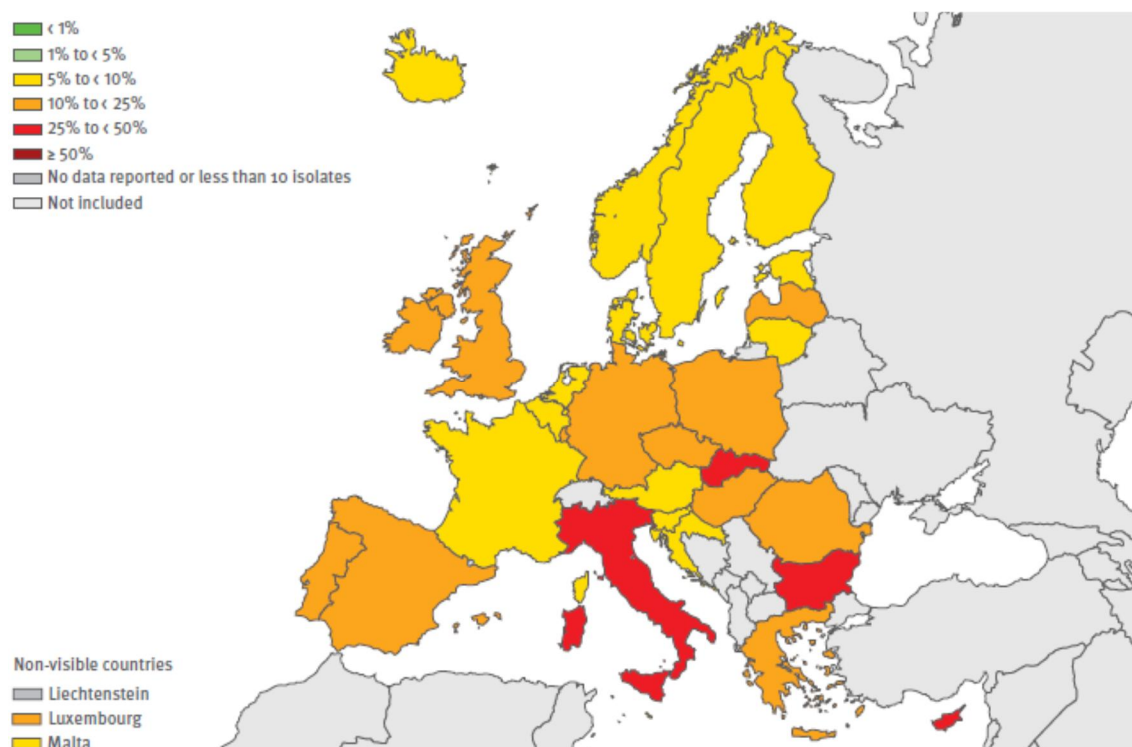
Uma outra família crescente de  $\beta$ -lactamases são as enzimas tipo OXA que conferem resistência à ampicilina e à cefalotina e caracterizam-se por ser altamente hidrolíticas contra aoxacilina e cloxacilina e são fracamente inibidas pelo inibidor de  $\beta$ -lactâmico (ácido clavulânico). Algumas enzimas da família OXA apresentam atividade

sobre os carbapenemos (ex.OXA-48), tendo surgido na *E. coli* e em outras *Enterobacteriaceae* ECDC, 2013).

É cada vez mais comum a constatação da existência de estirpes de *E. coli* que produzem vários tipos de ESBLs simultaneamente, metalo-beta-lactamases ou cefamicinas e também mecanismos de resistência a outros grupos de antibióticos, ou seja bactérias multiresistentes (ECDC, 2013, Coque, *et al.*, 2008).

Estudos de vigilância da evolução da resistência aos antibióticos, como a SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*), demonstraram que a produção de ESBLs é menos frequente na Europa do que na América Latina, Ásia e Regiões do Pacífico, mas mais comum do que na América Norte (Cantón, *et al.*, 2008, Coque, *et al.*, 2008).

Segundo dados da EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), no estudo efectuado em 2013 em que foi avaliada a percentagem de isolados de *E.coli* resistente às cefalosporinas de 3ª geração entre 2010 e 2013 nos vários países da Europa, em que demonstra a existência de uma maior percentagem de resistência nos países do Sul da Europa e menor nos países do Norte da Europa, (como evidenciado na Fig. 20), variando de 5% na Islândia e 39,6% na Bulgária, nenhum país mostrou uma tendência decrescente, durante esse período (ECDC, 2013).

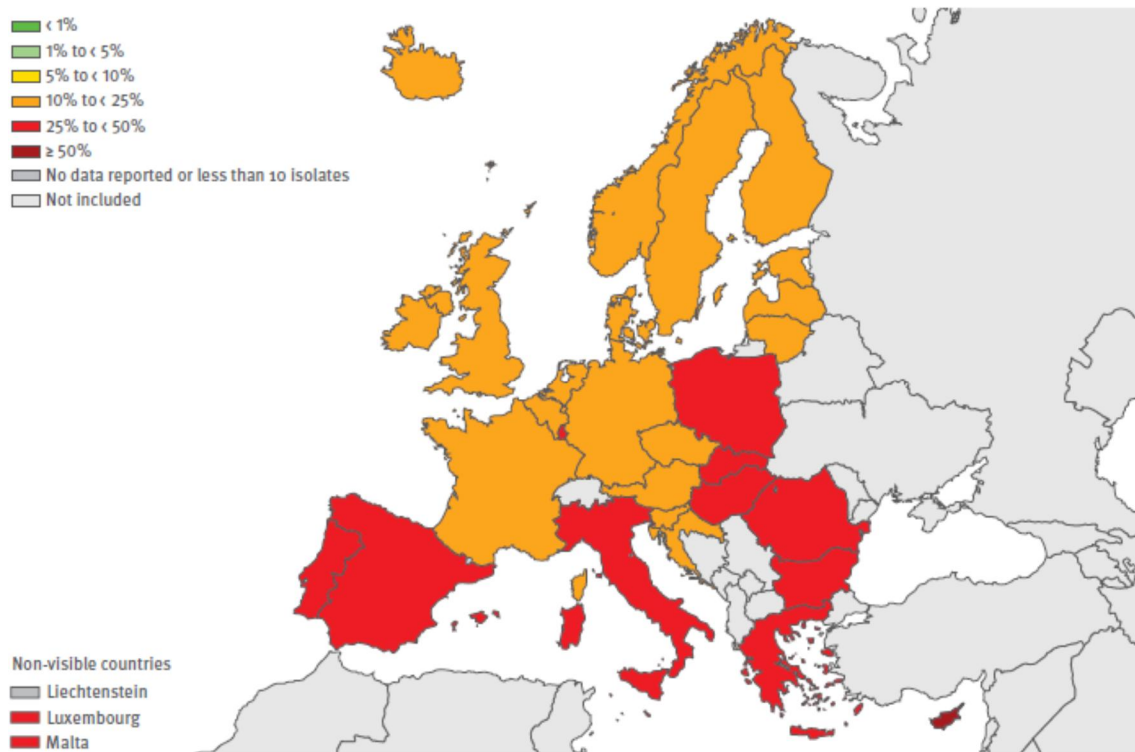


**Figura 20.** *Escherichia coli*: percentagem (%) de isolados invasivos com resistência às cefalosporinas de 3ª geração por país, países da EU/EEA, 2013.

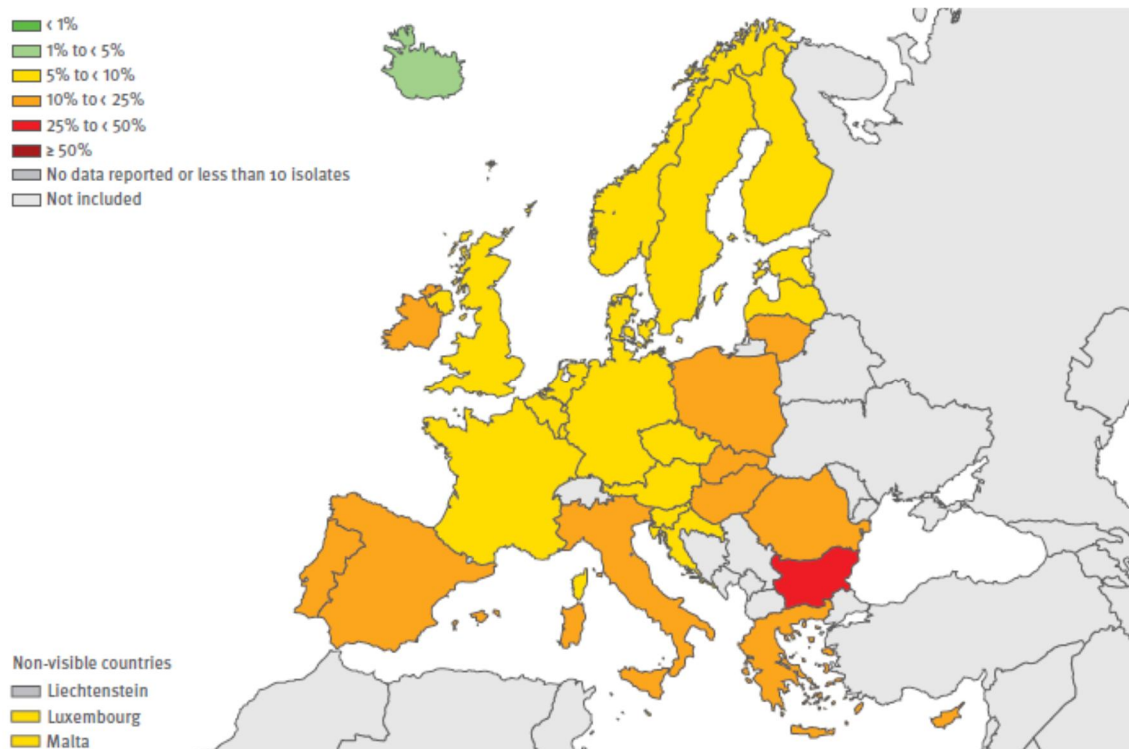
Na Europa a prevalência da *Enterobacteriaceae* produtoras de EBLs e o tipo de ESBLs varia de país para país, existindo uma ampla e rápida disseminação de algumas ESBLs pertencentes ao grupo TEM (TEM-4, TEM-24 e TEM-52), SHV (SHV-5, SHV-12) e CTX-M (CTX-M-9, CTX-M-3, CTX-M-14 e CTX-M-15) (Coque, *et al.*, 2008). A principal razão para o aumento generalizado na Europa das várias ESBLs anteriormente mencionados são devido a disseminação de clones específicos (ou grupos de clones) e de plasmídeos epidémicos, tanto a nível hospitalar como na comunidade (animais, humanos saudáveis e ambiente) (Coque *et al.*, 2008). Portugal é dos países da Europa com uma das taxas mais elevadas de ESBLs (Bouchillon *et al.*, 2004). Segundo alguns estudos publicados a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs tem aumentado ao longo do tempo, com predomínio de isolados de *E.coli* produtores de enzimas do tipo CTX-M (Machado *et al.*, 2006, Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2009). Os diferentes tipos de ESBLsem Portugal seguem a mesma tendência dos outros países da Europa com um domínio de

CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32, TEM-24, TEM-52, SHV-12 e GES-1 (Machado *et al.*, 2006, Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007).

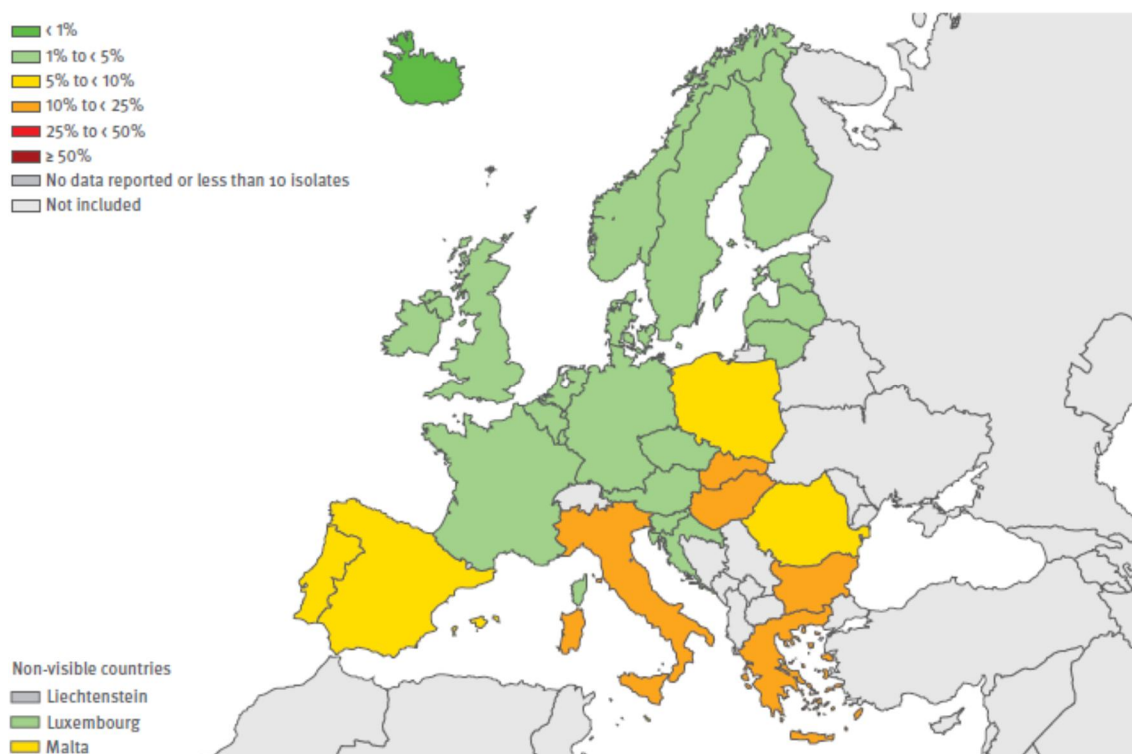
Segundo dados da EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), no estudo efectuado em 2013, em que foi avaliada a percentagem de isolados de *E. coli* resistente às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos entre 2010 e 2013, nos vários países da Europa, foi verificado que a resistência a estes dois grupos de fármacos apresenta a mesma tendência, ou seja há maior percentagem de resistência nos países do Sul da Europa do que no Norte da Europa. A percentagem de resistência as fluoroquinolonas varia entre 10,9% na Noruega e 51,9% no Chipre (Fig. 21) (ECDC, 2013), a percentagem de resistência aos aminoglicosídeos varia entre 4,1% na Islândia e 32,1% na Bulgária (Fig. 22), (ECDC, 2013). Neste mesmo estudo foi também avaliada a a resistência da *E. coli* aos carbapenemos, permanecendo ainda baixa na Europa (ECDC, 2013). Foi ainda avaliada a multirresistência da *E. coli* aos antibióticos de diferentes famílias como as cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos apresentando uma variação entre 0,9% na Islândia e 20,4% no Chipre (Fig. 23) (ECDC, 2013). A produção de ESBLs e a combinação com outros mecanismos de resistência são extremamente preocupantes, devido à limitação severa nas alternativas terapêuticas. O uso prudente dos agentes antimicrobianos e estabelecimento de medidas abrangentes de controlo de infeção são os principais pilares de intervenção eficaz e dos esforços de controlo para reduzir a selecção e transmissão de bactérias resistentes, incluindo a *E. coli* (ECDC, 2013).



**Figura 21.** *Escherichia coli*: porcentagem (%) de isolados invasivos com resistência às fluoroquinolonas, por país, países da EU/EEA, 2013.



**Figura 22.** *Escherichia coli*: porcentagem (%) de isolados invasivos com resistência aos aminoglicosídeos, por país, países da EU/EEA, 2013.



**Figura 23.** *Escherichia coli*: percentagem (%) de isolados invasivos com resistência combinada às cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, EU/EEA, 2013.

## 4.1.2 Antibióticos inibidores da síntese proteica

### 4.1.2.1 Aminoglicosídeos – Aminociclitolis

Os aminoglicosídeos são produzidos por microrganismos do Género *Streptomyces* (estreptomicina, neomicina, canamicina e tobramicina), pelo Género *Micromonospora spp* (gentamicina) ou com origem semissintética como a amicacina e a netilmicina. Este grupo bastante heterogéneo apresenta em comum um anel aminociclitol, derivado do inositol, unido a açúcares aminados através de ligações glicosídicas. Caracterizam-se por apresentar um amplo espectro de atividade, sendo ativos contra bactérias de Gram negativo e de Gram positivo (aeróbicas) (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Barroso, *et al.*, 2014).

Os aminoglicosídeos apresentam algumas vantagens terapêuticas, como: estabilidade metabólica, rápida ação bactericida, largo espectro de ação antibacteriana, sinergismo com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e raros fenómenos de hipersensibilidade, mas o seu uso prolongado pode originar nefrotoxicidade e ototoxicidade. (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Barroso, *et al.*, 2014, Murray, *et al.*, 2007).

**Mecanismo de ação** - são inibidores da síntese proteica, bloqueando irreversivelmente as subunidades dos ribossomas. O antibiótico penetra principalmente por transporte ativo a parede e a membrana citoplasmática da célula bacteriana e vai inibir a síntese proteica interagindo com a subunidade 30S dos ribossomas, levando a erros na leitura do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), provocando a lise das bactérias (efeito bactericida) (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Barroso, *et al.*, 2014).

**Resistência bacteriana** - a resistência a este grupo de antibióticos poderá ser devido a:

- Inativação enzimática do antibiótico, mediada por acetilases, fosforilases e adenilases (mecanismo de resistência mais frequente);
- Alteração dos ribossomas por mutação;
- Reduzida difusão através dos invólucros bacterianos (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Barroso, *et al.*, 2014).

**Uso clínico** - Os aminoglicosídeos são eliminados por via renal sendo recuperados na urina inalterados, sem perda da sua atividade antibacteriana. A sua eficácia no tratamento da infecção urinária é melhorada em meio alcalino, o pH ácido não favorece a incorporação dos aminoglicosídeos no citoplasma bacteriano. O sucesso do sinergismo existente entre os aminoglicosídeos e os  $\beta$ -lactâmicos principalmente contra estreptococos e enterococos deve-se ao facto dos antibióticos antiparietais afectarem a integridade da parede celular, favorecendo a penetração dos aminoglicosídeos (Sousa, 2006).

Os aminoglicosídeos quando administrados em doses subinibitórias podem reduzir drasticamente a aderência bacteriana às superfícies mucosas, sendo importante na prevenção da infecção urinária (Sousa, 2006).

### **4.1.3 Antibióticos inibidores da síntese os ácidos nucleicos**

#### *4.1.3.1 Quinolonas*

As quinolonas são uma das maiores classes de antibióticos utilizados a nível mundial no tratamento de infecções bacterianas quer na medicina humana como veterinária (Cattoir *et al.*, 2009; Mérens, *et al.*, 2010).

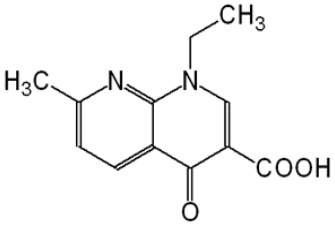
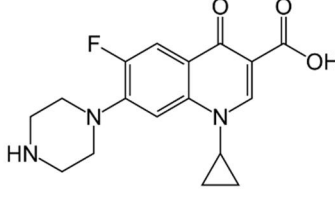
As quinolonas são antibióticos sintéticos, descobertos acidentalmente na década de 60, quando se verificou que o produto secundário da síntese da cloroquina, 7-cloroquinolona, apresentava propriedades bactericidas, surgindo assim a primeira quinolona, o ácido nalidíxico, utilizado no tratamento de cistite causada por bactérias de Gram negativo, (excepto a *Pseudomonas aeruginosa*) (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014).

Nos anos 80 surgem as fluoroquinolonas, que revolucionaram o tratamento das infecções. As fluorquinolonas possuem uma estrutura base que consiste na conservação do ácido carboxílico na posição 3 e a ligação dupla entre o carbono e o oxigénio na posição 4 do anel naphitridina, mantendo assim as suas propriedades de antibiose. Com a introdução do átomo de flúor ligado ao carbono 6 e a introdução de um ciclo aminado na posição 7, conferindo assim um espectro de ação mais largo, uma atividade antibacteriana intrínseca mais intensa, uma boa difusão para os tecidos e líquidos intracelulares e uma toxicidade mais reduzida (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Barroso, *et al.*, 2014, Murray, *et al.*, 2007).

Como as fluorquinolonas têm vindo a sofrer uma grande evolução houve necessidade de as agrupar em gerações, havendo neste momento já quatro gerações de

fluorquinolonas, como evidenciada na Tabela 4, adaptada de Barroso, *et al.*, 2014 (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Barroso, *et al.*, 2014).

**Tabela 4.** Estrutura química das quinolonas e as várias gerações

<p>Quinolonas</p> 	<p>Ácido nalidíxico</p>	<p>Quinolona de 1.<sup>a</sup> geração</p>
<p>Fluorquinolonas</p> 	<p>Ofloxacina</p>	<p>Quinolona de 2.<sup>a</sup> geração</p>
	<p>Pefloxacina</p>	
	<p>Norfloxacina</p>	
	<p>Lomefloxacina</p>	
	<p>Ciprofloxacina</p>	
	<p>Moxifloxacina</p>	
	<p>Levofloxacina</p>	
	<p>Gatifloxacina</p>	
	<p>Gemifloxacina</p>	
	<p>Trovafloxacina</p>	

**Mecanismo de ação** – as quinolonas tem como alvo duas enzimas bacterianas responsáveis e essenciais à replicação e transcrição do DNA, a *DNA girase* (ou *Topoisomerase II*) e a *Topoisomerase IV* (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Barroso, *et al.*, 2014).

A enzima *DNA girase* codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*, participa no superenrolamento negativo do DNA, ou seja, na direcção oposta ao da dupla hélice, fundamental para compactar a molécula de DNA dentro da célula bacteriana e consequentemente permitir a sua replicação. A enzima *Topoisomerase IV*, codificada pelos genes *parC* e *parE*, está envolvida no relaxamento e separação do DNA (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007, Barroso, *et al.*, 2014, Murray, *et al.*, 2007, Navarro *et al.*, 2010, Sousa, 1998). Ambas as topoisomerases são essenciais ao crescimento e divisão das células bacterianas, ao ser bloqueado a ação destas enzimas leva à morte bacteriana (Sousa, 1998).

Como as quinolonas exercem a sua atividade intracelularmente, o modo como acedem ao seu alvo varia mediante a bactéria seja de Gram negativo ou positivo. Nas bactérias de Gram positivo as quinolonas atingem o citoplasma após atravessarem a parede celular e a membrana citoplasmática. Nas bactérias de Gram negativo as quinolonas atravessam a membrana externa da parede celular através das proteínas transmembranares ou canais de porina *OmpF* e *OmpC* (na *Escherichia coli*) (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014).

**Resistência bacteriana** – poderá ocorrer por diversos mecanismos, podendo estes actuarem em conjunto ou individualmente (Barroso, *et al.*, 2014, Rodríguez-Martinez, *et al.*, 2010).

O surgimento de resistência às quinolonas usualmente tem origem em **mecanismos de resistência motivados por mutações cromossómicas** que condicionam:

-**Alterações nas enzimas alvo**, estas mutações ocorrem nos genes que codificam a *DNA girase* e *topoisomerase IV*, devido a substituições aminoácidas nas proteínas *gyrA/gyrB* e *parC/parE*, respectivamente. Estas mutações estão localizadas numa pequena região que codifica os aminoácidos 67 a 106, conhecida por região determinante da resistência a quinolonas (QRDR) (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014, Sousa, 1998, Bambeke, *et al.*, 2005).

-**Diminuição do acesso às enzimas alvo**: a diminuição da concentração das quinolonas no interior da bactéria deve-se à diminuição da permeabilidade causada por mutações nos genes que regulam a síntese dos canais de porina, ou devido a uma hiperexpressão das bombas de efluxo ativo (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014).

A resistência às quinolonas também poderá ter origem em mecanismos transmitidos horizontalmente mediados por plasmídios, PMQR, o que complica ainda mais a problemática das resistências bacterianas (Barroso, *et al.*, 2014, Rodríguez-Martinez *et al.*, 2010).

### **Os mecanismos de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos são:**

- **A protecção das enzimas alvo por proteínas *Qnr*** (*QnrA*, *QnrB*, *QnrS*, *QnrC*, *QnrD*), codificam pentapeptídeos que competem com as quinolonas pela ligação à *DNA girase* e *topoisomerase IV*, protegendo-as da inibição pelas quinolonas (Barroso, *et al.*, 2014, Rodríguez-Martinez *et al.*, 2010, Cattoir *et al.*, 2009, Zhao, *et al.*, 2010).

- **Inativação enzimática por AAC(6')-Ib-cr** promove a acetilação das fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) para além dos aminoglicosídeos, esta enzima resulta das mutações no gene *aac(6')-Ib* que é responsável pela expressão da enzima AAC(6')-Ib, esta enzima confere resistência aos aminoglicosídeos (tobramicina, amicacina e canamicina). As mutações responsáveis pela origem desta enzima advém da alteração aminoacídica no codão Triptofano 102 Arginina e Ácido aspártico 179 Tirosina, provocando assim a inativação ou redução das fluoroquinolonas (Barroso, *et al.*, 2014, Jacoby, *et al.*, 2009, Karah *et al.*, 2010, Rodríguez-Martinez *et al.*, 2010, Cattoir *et al.*, 2009).

- **Bombas de efluxo, *QepA* e *OqxAB***, responsáveis pela expulsão das fluoroquinolonas para o exterior da bactéria (Karah *et al.*, 2010, Cattoir *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2009).

O facto dos genes que codificam os mecanismos de resistência adquirida às quinolonas estarem localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos conjugativos, transposões, sequências de inserção, o que facilita a disseminação entre as várias espécies de *Enterobacteriaceae*. Estes elementos genéticos por vezes codificam genes de resistência a diferentes grupos de antibióticos, originando perfis de multiresistência (Rodríguez-Martinez *et al.*, 2010, Cattoir *et al.*, 2009).

#### 4.1.4 Antibióticos antimetabolitos

##### 4.1.4.1 Sulfonamidas

São análogos estruturais do ácido p-aminobenzoico (PABA), factor de crescimento, indispensável para a síntese de ácido fólico. São ativos contra bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, por mecanismo bacteriostáticos, impedindo o crescimento bacteriano por carência de ácido fólico (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014, Sousa, 1998).

**Mecanismo de ação** – as sulfonamidas competem com o PABA impedindo a sua adição à pteridina para a formação do ácido dihidropteróico, impedindo assim a formação do ácido fólico. A enzima dihidropteroato sintetase tem mais afinidade para as sulfonamidas do que para o PABA, o seu substrato natural (Sousa, 2006).

**Resistência bacteriana** – pode surgir após alterações da dihidropteroato sintetase devido a mutações cromossómicas (Sousa, 1998).

##### 4.1.4.2 Trimetopim

É estruturalmente semelhante ao ácido dihidrofólico, é um forte inibidor competitivo da enzima dihidrofolato redutase (DHFR). É ativo contra bactérias Gram positivo e Gram negativo e apresenta efeito bacteriostático (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014, Sousa, 1998).

**Mecanismo de ação** - este antibiótico é um inibidor competitivo da dihidrofolato redutase, a enzima que reduz o dihidrofolato a tetrahydrofolato, impedindo a síntese da timidina, purinas e formil-metionina, bloqueando a síntese de proteínas, de DNA e RNA (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014, Sousa, 1998).

**Resistência bacteriana** – devido a uma menor afinidade para a tetraidrofolato redutase (Sousa, 2006, Barroso, *et al.*, 2014, Sousa, 1998).

#### **4.1.4.3 Sulfanamidas / Trimetropim**

Desde 1968, a sulfonamida tem sido usada na terapêutica associada ao trimetropim. Quando trimetropim e sulfonamidas são usados em associação (respectivamente na proporção 1:5) denominado cotrimoxazole, tem um efeito sinérgico e bactericida, o que não é perfeitamente linear (Sousa, 2006- 26). A associação trimetropim com sulfametoxazol reduz sobretudo o desenvolvimento de resistência em relação à monoterapia e tem um espectro de atividade contra bactérias Gram positivo e Gram negativo (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007).

**Resistência bacteriana** – são vários os mecanismos que podem contribuir para a resistência bacteriana a estes antibióticos:

- I) Concentração intracelular do fármaco baixa, devido a impermeabilização da membrana externa ou devido a bombas de efluxo;
- II) Mutações (alteração da constituição enzimática da célula bacteriana);
- III) Resistência adquirida por plasmídeos (Sousa 2006).

#### **4.1.4.4 Nitrofurantoína**

Antibiótico utilizado especificamente no tratamento e profilaxia de infecção urinária baixa (cistite) (Sousa, 2006; Maaland e Guadabassi, 2011).

**Mecanismo de ação** – a nitrofurantoína afecta vários sistemas enzimáticos bacterianos, que vão afectar os metabolismos e a síntese de DNA e RNA. Apresenta um mecanismo de ação multifactorial sendo a lesão o DNA responsável pela morte celular. É um medicamento com boa absorção oral e com rápida eliminação urinária. Atinge na urina ácida elevada concentração, exercendo a sua ação bactericida contra os diferentes

agentes etiológicos da infecção urinária baixa, incluindo bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. Este agente antimicrobiano é mais ativo a pH ácido do que em meio alcalino, sendo por isso a sua ação limitada no tratamento das infecções urinária provocada por microrganismos produtores de urease (*Proteus spp*, *Klebsiella pneumoniae*) (Sousa, 2006, Forbes, *et al.*, 2007).

**Resistência bacteriana** – devido a sua atividade multifactorial, este antibiótico apresenta uma baixa taxa de resistência bacteriana, e não se tem observado resistências cruzadas com outros antibióticos. Um dos fatores que justifica a existência de baixa resistência é o facto de este fármaco apresentar uma fraca difusão através dos tecidos e baixa concentração no intestino, não favorecendo desenvolvimento de flora entérica resistente a nitrofurantoina, o que favorece assim o desenvolvimento lento de resistências bacterianas (Sousa, 2006).

## II. OBJETIVOS

Sendo a infecção do trato urinário uma das infecções bacterianas mais frequentes na comunidade e responsável pelas principais causas de morbidade e gastos associados aos cuidados de saúde (Narciso, *et al.*, 2012, Mendo, *et al.*, 2008), é de extrema importância a avaliação e conhecimento dos agentes causadores desta infecção, assim como a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos utilizados no seu tratamento e mecanismos de resistência associados (Rolo, *et al.*, 2009). O conhecimento da realidade epidemiológica e dos padrões de susceptibilidade antimicrobiana dos microrganismos nas diferentes zonas geográficas permite uma escolha mais adequada da terapêutica empírica e a limitação da disseminação das estirpes resistentes (Tavares, *et.al.*, 2014).

Com o presente estudo pretende-se analisar isolados de *Escherichia coli* causadores de infecção urinária em pacientes no Distrito do Porto com os seguintes objetivos:

1. Conhecer algumas características epidemiológicas associadas aos pacientes;
2. Conhecer o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos;
3. Avaliar a ocorrência e diversidade de ESBLs, qAmpCs e/ou carbapenemases entre os isolados resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos;
4. Avaliar a co-resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos entre os isolados produtores de ESBLs, qAmpC e/ou carbapenemases.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Isolados bacterianos

Foram incluídos no presente estudo 480 isolados de *Escherichia coli*, provenientes de amostras de urina de pacientes que requisitaram um exame bacteriológico à mesma no laboratório de prestação de serviços à comunidade “Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres”. Os isolados bacterianos foram recolhidos entre Dezembro de 2011 e Março de 2012, tendo sido seleccionadas aleatoriamente as primeiras 30 estirpes de *E. coli* semanalmente identificadas como agentes de infeção urinária.

#### 2. Identificação bacteriana

Os isolados bacterianos foram identificados no sistema automático VITEK®2 Systems (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France) utilizando a carta de identificação “Gram Negativos (GN)” (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France), a qual permite a identificação de espécies de bacilos de Gram negativo fermentadores e não fermentadores. A inoculação, incubação e interpretação dos resultados foram efetuados seguindo as instruções do fabricante.

#### 3. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

A avaliação da susceptibilidade aos antibióticos foi também efectuada recorrendo ao sistema automático VITEK®2 Systems (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France), utilizando a carta de antibiograma “AST-N113” (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France). A carta “AST-N113” é constituída por um micropoço controlo (contendo apenas meio de cultura) e 64 micropoços contendo meio de cultura e quantidades conhecidas dos seguintes antibióticos: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefalotina, cefotaxime, cefuroxima, cefoxitina, ceftazidima, cefepime, ertapenemo, imipenemo, fosfomicina, nitrofurantoína, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, amicacina,

gentamicina, tobramicina e trimetoprim-sulfametoxazol. A detecção da produção de ESBLs foi realizada com base nas diferenças de crescimento verificadas em poços contendo cefotaxima, ceftazidima ou cefepime sem ácido clavulânico, comparativamente a poços contendo os mesmos antibióticos em associação com o ácido clavulânico, permitindo assim a determinação de um resultado positivo ou negativo. A inoculação e incubação da carta foram efectuadas seguindo as instruções do fabricante. No final da incubação, o sistema automático disponibilizou os valores de CMI (concentração mínima inibitória) para cada antibiótico testado e associou os mesmos à espécie identificada, de forma a determinar uma interpretação da categoria (sensível, intermédio ou resistente) e fornecer uma leitura interpretada conducente à detecção de mecanismos de resistência específicos (por exemplo, produção de ESBLs e/ou carbapenemases). A interpretação dos valores de CMI foi feita pelo sistema automático segundo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI®, 2009).

#### **4. Detecção da expressão de ESBLs e selecção de isolados presumíveis produtores de qAmpC**

Nos isolados de *E. coli* resistentes às cefalosporinas de largo espectro (ceftazidima, cefotaxima e/ou cefepime), identificados ou não como presumíveis produtores de ESBLs pelo VITEK®2 Systems, foi analisada a expressão de ESBLs através do teste do duplo sinergismo (DDST, *Double Disc Sinergy Test*) (Jarlier *et al.*, 1988), utilizando o meio de Mueller-Hinton agar e discos contendo ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), cefepime (30µg) e aztreonamo (30µg) colocados a 20 mm de um disco contendo amoxicilina e ácido clavulânico (30µg) (Jarlier *et al.*, 1988; CLSI 2009). Os isolados de *E. coli* que adicionalmente demonstraram ser resistentes à cefoxitina e/ou a associações β-lactâmicos/inibidores de β-lactamases foram identificados como presumíveis produtores de qAmpC. Nestes isolados a confirmação da expressão de qAmpC não foi efectuada por testes fenotípicos, tendo-se efectuado directamente a pesquisa e a caracterização molecular de genes *bla*<sub>qAmpC</sub> recorrendo à técnica de PCR (ver secção 5).

## **5. Detecção e caracterização molecular de genes que codificam para *bla*<sub>ESBL</sub> e *bla*<sub>qAmpC</sub>.**

### **A. Extração do DNA bacteriano**

Nos isolados onde foi detectada a expressão de ESBLs e/ou identificados como presumíveis produtores de qAmpC foi efectuada a extração do DNA bacteriano para posterior caracterização molecular dos genes.

A extração do DNA foi realizada a partir de uma cultura pura de cada isolado bacteriano, da qual foram retiradas 3 a 4 colónias que foram colocadas em 300 µL de água ultra pura estéril. Após homogeneização, foi efectuada a lise bacteriana através do processo de fervura em banho durante 15 minutos. No final fez-se uma centrifugação durante 5 min a 14000 r.p.m. e retirou-se 250 µL do sobrenadante obtido contendo o DNA extraído, congelando-se a -20°C para os estudos posteriores.

### **B. Amplificação de ácidos nucleicos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

A deteção e caracterização molecular de genes *bla*<sub>ESBL</sub> e *bla*<sub>qAmpC</sub> foi efectuada pela técnica de PCR. Todas as reacções foram efectuadas num volume final de 25 µL, contendo *primers* (0.8 µM), deoxinucleótidos (dNTP's, 0.2 mM; Finnzymes, Espoo, Finlândia), MgCl<sub>2</sub> (1.0-2.0 mM), tampão da enzima (1X, Green GoTaq® Flexi Buffer, Promega, USA), enzima *Taq* DNA polimerase (1.0 U, GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega, Madison, EUA), água ultra pura estéril para diluir os reagentes até à concentração pretendida e 2 µL de DNA bacteriano. As condições de amplificação e as sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 5. As reacções de PCR foram realizadas nos termocicladores MyCycler™ (Bio-Rad, Hercules, EUA) e ICycler™ (Bio-Rad, Hércules, EUA).

### **C. Electoforese**

Os produtos amplificados foram posteriormente analisados através de electroforese em gel de agarose a 1.5% contendo 0,03 $\mu$ L/mL de SYBR Safe<sup>TM</sup> DNA Gel Stain (Invitrogen, Paisly, United Kingdom) como marcador fluorescente intercalador de ácidos nucleicos, de forma a ser possível a visualização dos produtos amplificados sob luz UV de um transiluminador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). As condições de electroforese foram 110V, 35 minutos, tampão TAE 1X. Os produtos amplificados foram visualizados sob luz UV em transiluminador acoplado ao sistema de aquisição de imagem *Molecular Imager ChemiDoc<sup>XRS</sup>* (Milão, Itália). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular HyperLadder<sup>TM</sup> IV (Bioline, Uppsala, UK).

### **D. Purificação dos produtos amplificados**

Os produtos de PCR foram purificados recorrendo ao sistema de purificação GRS PCR & Gel Band Purification (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal), seguindo as instruções do fabricante.

### **E. Sequenciação**

Os produtos de PCR purificados foram enviados para a empresa STAB VIDA (Oeiras, Portugal) para sequenciação. As reacções de sequenciação foram efectuadas em sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA).

**Tabela 5.** Primers e condições de PCR usados para a amplificação e sequenciação de genes *bla<sub>ESBL</sub>* e *bla<sub>qAmpC</sub>*

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp)	Gene(s) <sup>a</sup>	Condições de amplificação	Referência(s)
TEM-F	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG	868	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
TEM-R	CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA				
SHV-1	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC	930	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
SHV-2	TTA GCG TTG CCA GTG CTC				
CTX-M-F'	TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA	544	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 51°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Edelstein <i>et al.</i> , 2003
CTX-M-R'	CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A				
CTXM1-F3	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC	499	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (grupo I)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTXM1-R2	AGC CGC CGA CGC TAA TAC A				
Toho1-F2	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C	351	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (grupo II)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Pitout <i>et al.</i> , 2004
Toho1-R	CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC				
CTXM825F	CGC TTT GCC ATG TGC AGC ACC	307	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (grupo III)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTXM825R	GCT CAG TAC GAT CGA GCC				
CTXM9/14-F	GCT GGA GAA AAG CAG CGG AG	474	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (grupo IV)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTXM9/14-R	GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG				
CTX-M-10deg-F	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGY C	889	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (grupo I, sequenciação)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Machado <i>et al.</i> , 2006
CTX-M-15rv	TCC GTT TCC GCT ATT ACA AAC				
CTX-M-9-F	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC	544	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> (grupo IV, sequenciação)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Coque <i>et al.</i> , 2002
CTX-M-9-D	GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG				
AmpC /I FW	GAT GGC AAR GCC CAC TAY TC	917	<i>bla<sub>CMY/MOX/FOX</sub></i>	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 64°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
AmpC /I Rev	TTG GCC AGC ATG ACG ATG				
AmpC 1_F	ATG ATG AAA AAA TCG TTA TGC	1143	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i> like	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Koeck <i>et al.</i> , 1997
AmpC2_R	TTG CAG CTT TTC AAG AAT GCG C				
AmpC III Fw	CAT TAA ACC GCT GAT GGC AC	1008	<i>bla<sub>DHA/MOR</sub></i>	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
AmpC III Rev	GCT TTG ACT CTT TCG GTA TTC G				
AmpC/IV_Fw	AAG GTG CTC TGG CTG CTA ATA TC	1094	<i>bla<sub>ACC</sub></i>	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
AmpC/IV_Rev	TTC CAA TGA GCT CAG GAT TTT AAC				

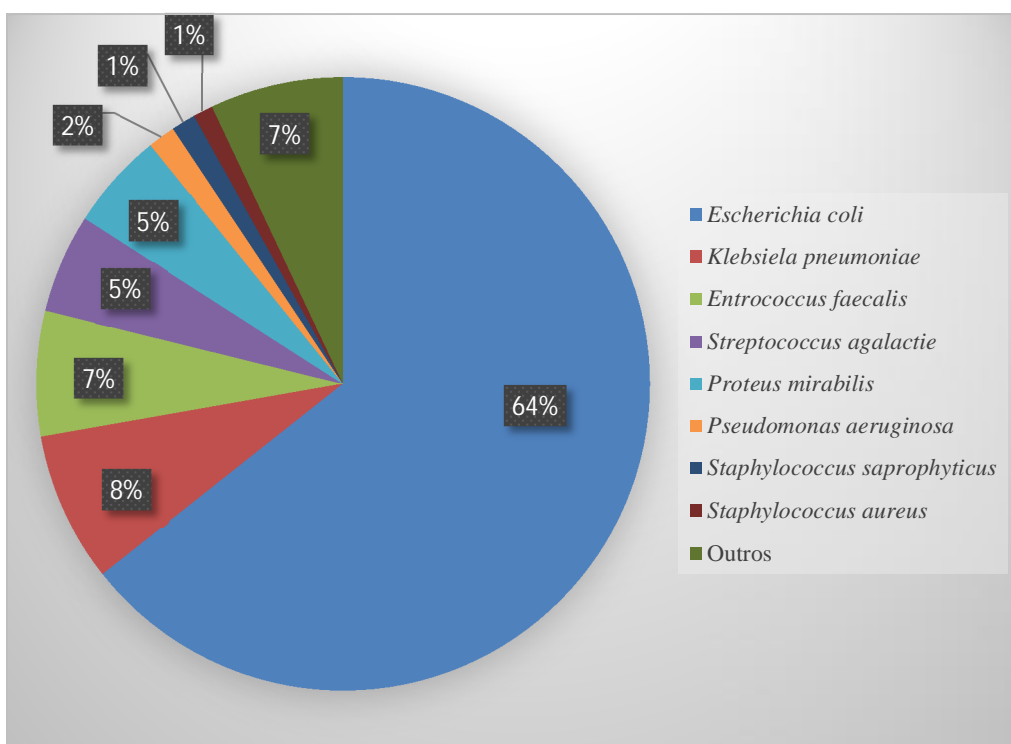
<sup>a</sup>Grupo I inclui CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30 e outras mais recentes; Grupo II inclui CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, Toho-1 e outras mais recentes; Grupo III inclui CTX-M-8, CTX-M-25, e outras mais recentes; Grupo IV inclui CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -27, Toho-2 e outras mais recentes

## IV. RESULTADOS

### 1. Caracterização epidemiológica dos isolados de *E. coli*

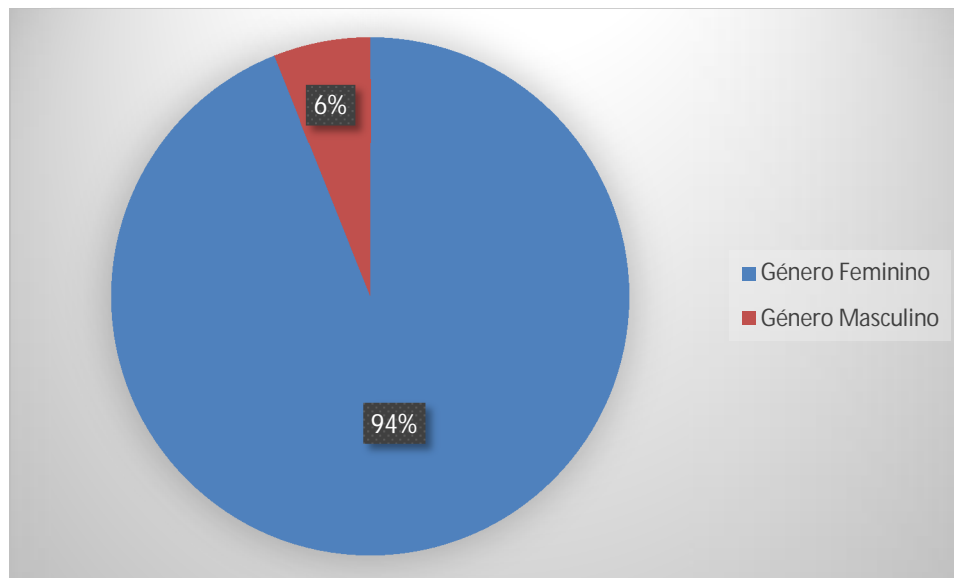
Durante o período de realização deste estudo, foram recebidos no sector de Microbiologia do laboratório de prestação de serviços à comunidade “Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres” um total de 13644 pedidos de exames bacteriológicos de amostra de urina, dos quais 10674 (78,2%) apresentaram resultado negativo, ou seja ausência de crescimento significativo de microrganismos, e 2970 (21,8%) resultado positivo, isto é, com crescimento microbiano igual ou superior a  $10^5$  UFC/ml.

*E. coli* foi a espécie predominantemente identificada como agente etiológico de infecção urinária (64,3%; 1911/2970), seguida de *Klebsiella pneumoniae* (8%), *Enterococcus faecalis* (7%), *Proteus mirabilis* (5%), *Streptococcus agalactiae* (5%) *Pseudomonas aeruginosa* (2%), *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (1%). Outras espécies apresentaram valores de ocorrência inferiores a 1% (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Ocorrência de diferentes espécies bacterianas em amostras de urina de pacientes com ITU no período temporal (Dezembro 2011-Março 2012).

Entre os 480 isolados de *E. coli* selecionados para este estudo segundo o critério anteriormente definido, 94% (n=451) foram proveniente de indivíduos do género feminino e 6% (n=29) do género masculino (Gráfico 2).



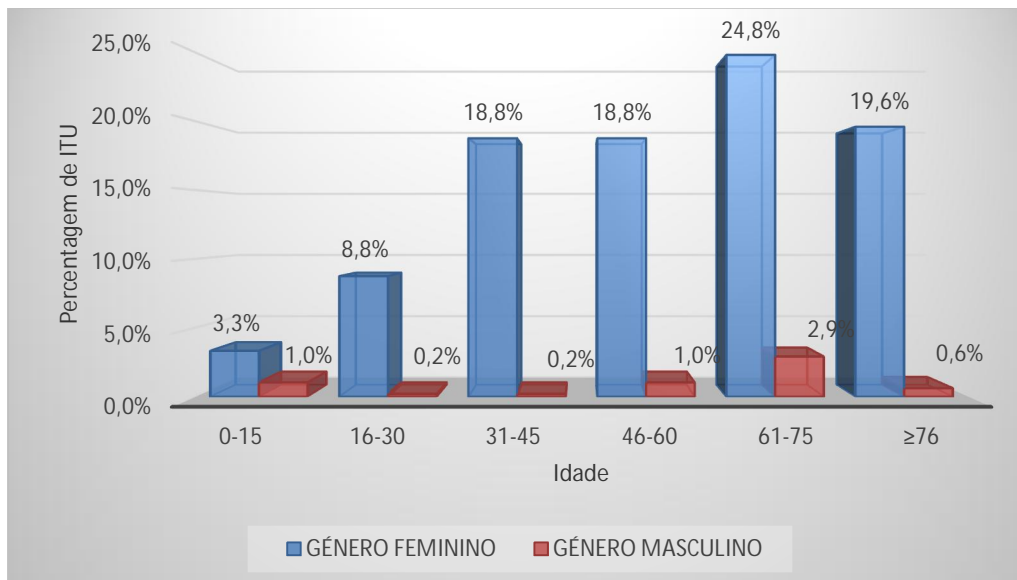
**Gráfico 2.** Distribuição por género dos pacientes com ITU causadas por *E.coli* incluídas neste estudo.

As idades dos pacientes incluídos neste estudo variaram entre os 3 meses e os 97 anos, sendo que 4,3% apresentavam idade igual ou inferior a 15 anos, 9% idade entre os 16 anos e os 30 anos, entre os 31 a 45 anos e dos 46 aos 60 anos as percentagem de ocorrência de ITU foram de 19% e 19,8% respectivamente, dos 61 aos 75 anos verificou-se o maior pico de ocorrência de infeção, 27,7% e 20,2% dos pacientes apresentavam idade igual ou superior a 75 anos (Gráfico 2).

No sexo feminino a maior ocorrência de ITU foi verificada na classe etária dos 61-75 anos (24,9%) e em idades superiores a 76 anos (19,6%), sendo que nas faixas etárias dos 46-60 anos e 31-45 anos a ocorrência de infeção foi semelhante (18,8% e 18,6%, respectivamente). Na classe etária mais jovem, dos 16-30 anos, a ocorrência foi de 8,6%. Nas idades entre os 0-15 anos a ocorrência de ITU foi de 3,3% (gráfico 3).

No género masculino a maior ocorrência de ITU foi na classe etária dos 61-75 anos (2,9%). Nas classes dos 0-15 anos e dos 46-60 anos obteve-se a mesma

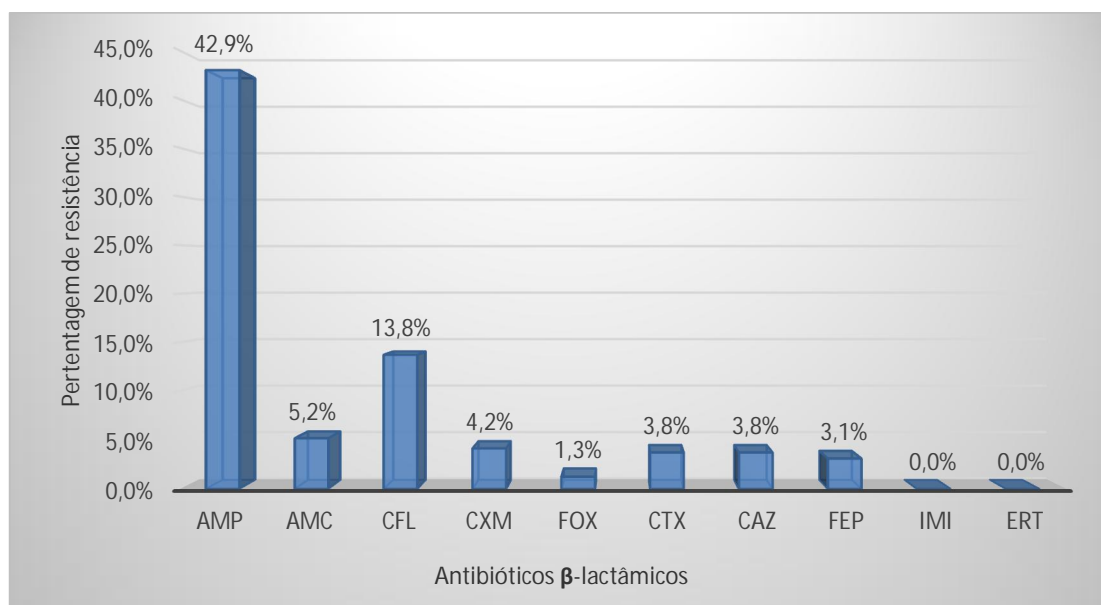
percentagem de ocorrência (1,0%), e em idades superiores a 76 anos a ocorrência de infecção foi de 0,6%. Nas classes dos 16-30 e dos 31-45 anos a ocorrência de ITU foi muito baixa (0,2%) (gráfico 3).



**Gráfico 3.** Ocorrência de ITU por classe etária.

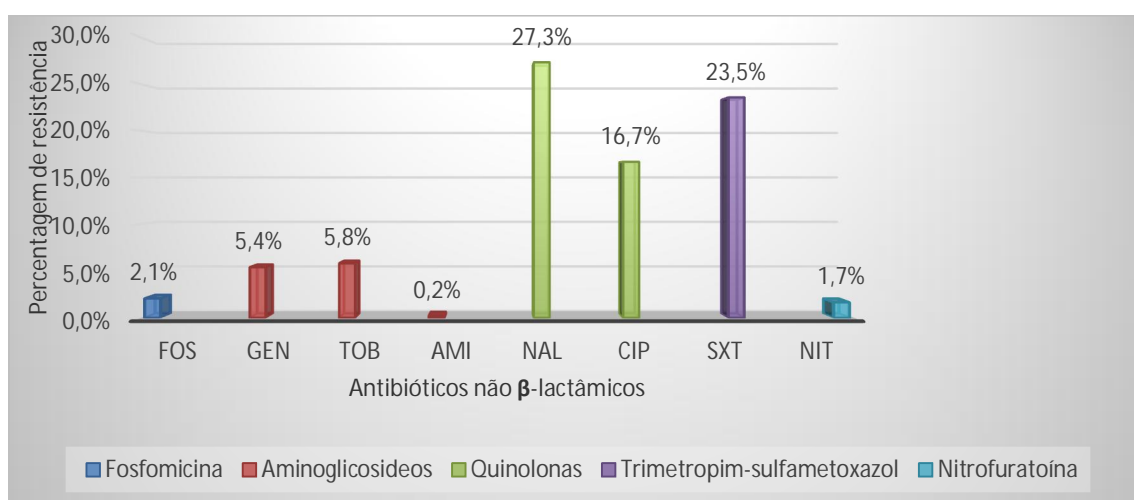
## 2. Susceptibilidade aos antibióticos

No estudo de susceptibilidade aos diferentes antibióticos foi possível constatar que o antibiótico do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos ao qual *E. coli* apresentou maior resistência foi à ampicilina (42,9%). A taxa de resistência foi significativamente mais baixa para a associação amoxicilina/ácido clavulânico (5,2%). No caso da cefalotina, uma cefalosporina de 1º geração, a percentagem de resistência foi de 13,8%. Para as cefalosporinas de 2º geração a resistência foi mais baixa, sendo de 4,2% para a cefuroxima e de 1,3% para a cefoxitina (uma cefamicina). Para as cefosporinas de 3º geração, obtiveram-se percentagens de resistência semelhantes (3,8% tanto para a cefotaxima, como para a ceftazidima). Quanto à taxa de resistência ao cefepime, uma cefalosporina de 4º geração, aquela foi de 3,1%. Nenhum isolado analisado apresentou resistência aos carbapenemos testados (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Percentagem de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. AMP – Ampicilina; AMC-Amóxicilina-Ácido Clavulânico; CFL-Cefalotina; CXM-Cefuroxima; FOX-Cefoxitina; CTX-Cefotaxima; CAZ-Ceftazidima; FEP-Cefpime; IMP-Imipenemo; ERT- Ertapenemo-

Na avaliação dos perfis de resistência às outras classes de antibióticos, verificou-se uma elevada percentagem de resistência às quinolonas, nomeadamente ao ácido nalidíxico (27,3%) e à ciprofloxacina (16,7%). A resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol foi de 23,5%. Para os aminoglicosídeos a percentagem de resistência foi relativamente inferior, sendo de 5,8% para a tobramicina, 5,4% para a gentamicina e 0,2% para a amicacina. As taxas de resistência à nitrofurantoína (1,7%) e à fosfomicina (2,1%) foram também baixas (Gráfico 5).



**Gráfico 5.** Percentagem de resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos. Nal.- Ácido Nalidíxico; CIP-Ciprofloxacina; SXT-Trimetoprim-Sulfametoxazol; GEN-Gentamicina; TOB-Tobramicina; AMIC-Amicacina; NIT-Nitrofurantoína; FOS-Fosfomicina

### 3. Ocorrência e diversidade de ESBLs, qAmpC e/ou carbapenemases

Foram identificados 14 isolados bacterianos como presumíveis produtores de ESBL de acordo com os critérios fenotípicos previamente definidos (ver secção 4 de Material e Métodos), dos quais 13 tinham sido previamente detectados como produtores de ESBLs pelo sistema automático Vitek2.

A expressão de ESBL foi confirmada pelo teste de DDST em todos os isolados, pelo que a ocorrência de isolados de *E. coli* produtores de ESBLs na amostra estudada foi de 3% (14/480) (Tabela 6).

Os genes *bla*<sub>ESBLs</sub> identificados foram *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=12) ou *bla*<sub>SHV</sub> (n=2). Não foi detectado nenhum isolado contendo genes codificando para ESBLs do tipo TEM.

Entre os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> que foram sequenciadas verificou-se somente a existência de dois tipos distintos: *bla*<sub>CTX-M-14</sub> e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> não sequenciados neste trabalho pertenciam também ao grupo 1 (n=7) e ao grupo 4 (n=1). Em 1 isolado produtor de CTX-M-15 verificou-se a expressão simultânea de uma  $\beta$ -lactamase TEM-1. Os genes *bla*<sub>SHV</sub> foram todos identificados como *bla*<sub>SHV-12</sub> (Tabela 6).

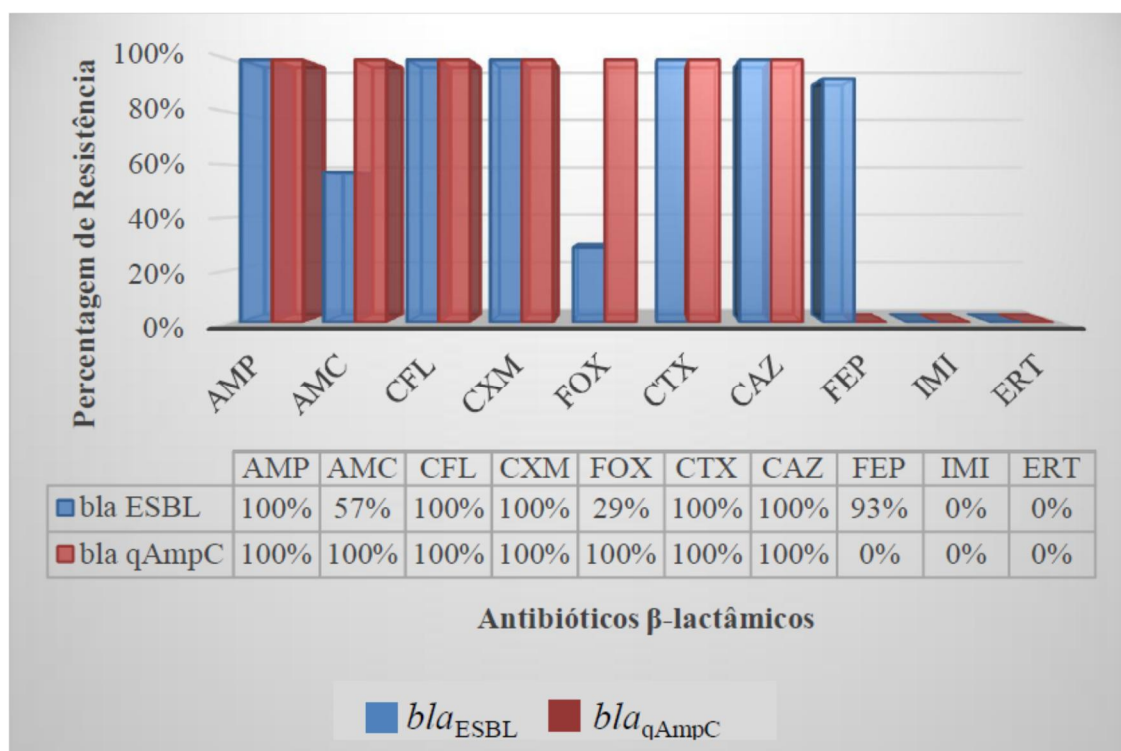
Adicionalmente, foram identificados 7 isolados de *E. coli* com fenótipo compatível com a produção qAmpC (FOX<sup>I/R</sup>, AMC<sup>I/R</sup>) na amostra analisada. A presença de genes *bla*<sub>qAmpC</sub> foi detectada em 4 desses isolados tendo os genes sido identificados como *bla*<sub>CMY-2</sub>. Um dos isolados apresentou simultaneamente *bla*<sub>CMY-2</sub> e *bla*<sub>SHV-12</sub> (tabela 6).

Nos restantes 3 isolados assinalados como presumíveis produtores de qAmpC, não foi detectada a presença de genes *bla*<sub>qAmpC</sub>, pelo que a resistência intermédia à cefoxitina dever-se-á a outros mecanismos de resistência.

Neste estudo não foi detectado nenhum isolado produtor de carbapenemases.

#### 4. Resistência a antibióticos em isolados produtores de ESBLs e/ou qAmpCs

Além do fenótipo de resistência característico de isolados produtores de ESBLs, neste estudo verificou-se que 57% dos isolados produtores de ESBLs apresentaram resistência (ou resistência intermédia) à associação de amoxicilina com o inibidor de  $\beta$ -lactamases ácido clavulânico, e 29% apresentaram resistência (ou resistência intermédia) à cefoxitina (Gráfico 6).

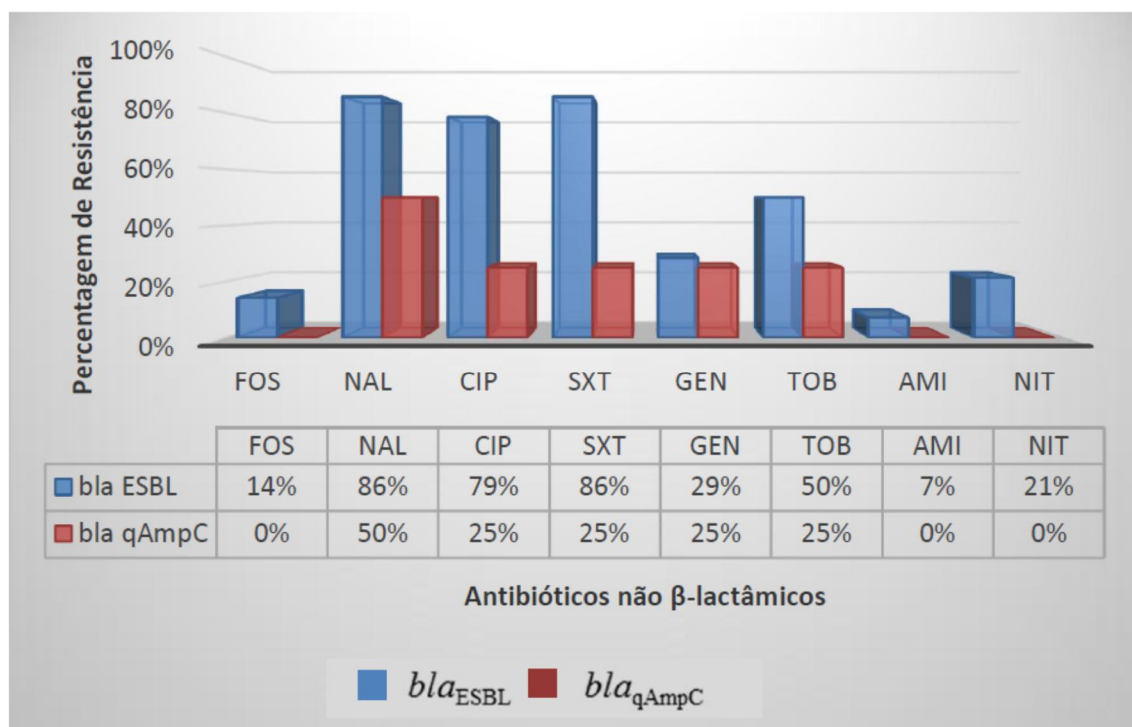


**Gráfico 6.** Resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em isolados contendo *bla*<sub>ESBLs</sub> e/ou *bla*<sub>qAmpC</sub>. AMP – Ampicilina; AMC-Amóxacilina-Ácido Clavulânico; CFL-Cefalotina; CXM-Cefuroxima; FOX-Cefoxitina; CTX-Cefotaxima; CAZ-Ceftazidima; FEP-Cefpime; IMP-Imipenemo; ERT- Ertapenemo-

Para além da avaliação dos perfis de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, neste estudo também foi avaliada a resistência a outras classes de antibióticos, nomeadamente às quinolonas, aos aminoglicosídeos, à nitrofurantoína, à fosfomicina e ao trimetoprim-sulfamatoxazole.

Nos isolados produtores de ESBLs a taxa de resistência às quinolonas foi elevada, sendo de 86% para o ácido nalidíxico e de 79% para a ciprofloxacina. Para a associação trimetoprim-sulfametoxazol a taxa de resistência foi também muito elevada (86%). Já para os aminoglicosídeos, as taxas de resistência observadas foram mais baixas, sendo de 50% para a tobramicina, 29% para a gentamicina e 7% para a amicacina. Verificou-se que 21% dos isolados produtores de ESBLs apresentaram resistência à nitrofurantoína e 14% à fosfomicina (Gráfico 7).

Entre os isolados produtores de qAmpC, para além do fenótipo característico de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Gráfico 6), observou-se resistência a outros grupos de antibióticos. A resistência às quinolonas foi elevada, sendo de 50% para o ácido nalidíxico e 25% para a ciprofloxacina. A taxa de resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol foi de 25%, e para o grupo dos aminoglicosídeos, a taxa de resistência variou entre 0-25% (25% para a tobramicina, 25% para a gentamicina e 0% para a amicacina). Nenhum isolado produtor de qAmpC apresentou resistência à nitrofurantoína ou à fosfomicina (Gráfico 7).



**Gráfico 7.** Resistência aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos em isolados contendo *bla*<sub>ESBLs</sub> e/ou *bla*<sub>qAmpC</sub>. Nal.- ácido Nalidíxico; CIP-Ciprofloxacina; SXT-Trimetoprim-Sulfametoxazol; GEN-Gentamicina; TOB-Tobramicina; AMIC-Amicacina; NIT-Nitrofurantoína; FOS-Fosfomicina.

Verificou-se também que 86% (12/14) dos isolados produtores de ESBLs e 25% (1/4) dos isolados produtores de qAmpCs analisados neste estudo apresentaram um fenótipo de multirresistência, ou seja, resistência a três ou mais classes de antibióticos, incluindo a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Tabela 6) (Coque, et al., 2008; Strahilevitz et al., 2009; Linhares, et al; 2015)

**Tabela 6.** Caracterização dos isolados de *E. coli* produtores de ESBLs e/ou qAmpC detectados neste estudo.

Nr. do Isolado	Teste ESBL (VITEK 2)	DDST	Gene <i>bla</i>	Perfil de resistência a antibióticos $\beta$ -lactâmicos										Perfil de resistência a antibióticos não $\beta$ -lactâmicos							
				AMP	AMC	CFL	CXM	FOX	CTX	CAZ	FEP	IMI	ERT	FOS	AC. Nal.	CIP	SXT	GEN	TOB	AMIC	NIT
B2	POS	POS	CTX-M-G1	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
B3*	POS	POS	CTM-M-15/	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
B4	POS	POS	TEM-1 CTX-M-G1	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
B5*	POS	POS	CTM-M-14	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	I
B6	POS	POS	CTX-M-G1	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
B7	POS	POS	CTX-M-G1	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
B8*	POS	POS	<i>bla</i> ESBL TEM-1/ CTX-M-15	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
B9	POS	POS	CTX-M-G1	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	I
B10	POS	POS	CTX-M-G1	R	I	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
B11	POS	POS	CTX-M-G1	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S
B12*	POS	POS	CTX-M-15	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S
B13*	POS	POS	SHV-12/	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R
B14	POS	POS	TEM-1 CTX-M-G4	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
B16*	NEG	POS	<i>bla</i> ESBL / <i>bla</i> AmpC	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B15*	NEG	NEG	CMY-2	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
B17*	NEG	NEG	<i>bla</i> qAmpC CMY-2	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S
B18*	NEG	NEG	CMY-2	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda- \*- Isolados sequenciados; AMP – Ampicilina; AMC-Amóxacilina-Ácido Clavulânico; CFL-Cefalotina; CXM-Cefuroxima; FOX-Cefoxitina; CTX-Cefotaxima; CAZ-Ceftazidima; FEP-Cefpime; IMP-Imipenemo; ERT- Ertapenemo; Ac. Nal.- ácido Nalidíxico; CIP-Ciprofloxacina; SXT-Trimetropim-Sulfametoxazol; GEN-Gentamicina; TOB-Tobramicina; AMIC-Amicacina; NIT-Nitrofurantoína; F-Fosfomicina.

Grupo I inclui CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30 e outras mais recentes;  
Grupo IV inclui CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -27, Toho-2 e outras mais recentes

## V. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

*Escherichia coli* é um habitante da microbiota do intestino do Homem e algumas das estirpes possuem características de virulência para causarem infecção no trato urinário (UTI), sendo o agente etiológico principal desta infecção, em ambiente hospitalar e na comunidade (Sousa, 1998, Barroso, *et al.*, 2014, Rolo, *et al.*, 2009).

A infecção do trato urinário ocorre predominantemente pela mobilidade das estirpes uropatogênicas de *E. coli* do trato intestinal para a área periuretral e sua ascensão via uretral para a bexiga (cistite), podendo atingir o parênquima renal (pielonefrite) (Forbes, *et al.*, 2007, Martins, *et al.*, 2010, Seely, *et al.*, 1995).

O tratamento da ITU não complicada requer a utilização oral de antibióticos de eliminação urinária, nomeadamente  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, sulfanamidas, fosfomicina e nitrofurantoína e nas situações clínicas mais complicadas recorre-se ao uso parentérico de aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos (Sousa 2006).

O tratamento de UTI por estirpes uropatogênicas de *E. coli* não produtoras de  $\beta$ -lactamases faz-se com aminopenicilinas, mas presentemente estas estirpes produzem  $\beta$ -lactamases plasmídicas TEM-1, tornado-se resistentes às aminopenicilinas, mas susceptíveis à associação de amoxicilina com ácido clavulânico e às cefalosporinas (oximinocefalosporinas) (Sousa 2006).

Nas duas últimas décadas as estirpes uropatogênicas de *E. coli* exibem maior resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, graças à presença de genes produtores de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBLs-Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases), nomeadamente do tipo CTX-M, tornando as cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração inoperantes, e do tipo qAmpC que confere resistência também à cefoxitina e aos inibidores das  $\beta$ -lactamases (Machado *et al.*, 2007, Mendonça, *et al.*, 2007, Cantón, *et al.*, 2012).

O presente estudo pretende avaliar o perfil de resistências de 480 isolados uropatogênicos de *E. coli* aos antibióticos usados no tratamento da UTI, isoladas num

laboratório de prestação de serviços à comunidade “Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres” do distrito do Porto.

A identificação dos isolados urinários e o antibiograma foram realizados no sistema VITEK®2 Systems.

Cerca de 206 (42,9%) dos isolados de *E. coli* exibiam *in vitro* resistência à ampicilina e dado o facto de existirem menor resistência à associação amoxicilina com ácido clavulânico (5,2%) e às oximinocefalosporinas (3,8-4,2%), indicam a presença de  $\beta$ -lactamases (gene *bla*). A maioria dos isolados resistentes à ampicilina eram susceptíveis aos inibidores das  $\beta$ -lactamases e às oximinocefalosporinas, indicativo da presença de  $\beta$ -lactamases de espectro reduzido (tipo TEM-1).

Catorze (3%) dos isolados de *E. coli* resistentes à ampicilina exibiam co-resistência às cefalosporinas da 3ª geração (ceftazidima e cefotaxima), sendo identificadas pelo sistema VITEK®2 Systems como presumíveis produtoras de ESBLs. Os catorze isolados foram fenotipicamente estudadas pelo teste do duplo sinergismo (DDST), confirmando a existência de ESBLs. A caracterização molecular dos catorze isolados de *E. coli* mostrou em 12 isolados a presença do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> (CTX-M-14 e CTX-M-15) e em 2 isolados a presença do gene *bla*<sub>SHV</sub> (SHV-12).

Em sete (1,5%) isolados de *E. coli* foi observado o fenótipo de resistência à cefoxitina e ao inibidor ácido clavulânico, indicando a possibilidade de tratar-se de estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases plasmídicas qAmpC, o que foi confirmado por ensaios de biologia molecular em 4 dos 7 isolados de *E. coli* com a presença do gene *bla*<sub>CMY-2</sub>. Num destes isolados ocorrem também a presença do gene *bla*<sub>SHV-12</sub>.

Estes dados confirmam que na comunidade como aliás acontece nos isolados hospitalares, há a possibilidade de insucesso terapêutico com a utilização de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos na ausência de ensaios *in vitro* para o screening das resistências presentes nos isolados uropatogénicos de *E. coli*.

Os isolados uropatogênicos de *E. coli* também revelaram a elevada resistência às quinolonas (ciprofloxacina com 16,7%) e ao trimetropim-sulfametoxazol (com 23,5%) e cerca de 6% de resistência aos aminoglicosídeos (gentamicina e tobramicina), exceto à amicacina (0,2%). Nitrofurantoína (1,7%) e fosfomicina (2,1%) mostraram boa eficácia *in vitro*, o que vem confirmar a importância destes dois antibióticos no tratamento de UTI, mesmo em casos de tratamento empírico.

Entre os catorze isolados de *E. coli* produtores de  $\beta$ -lactamases (genes ESBLs) a taxa de resistência à ciprofloxacina foi muito elevada (79%), ao trimetropim-sulfametoxazol foi de 86% e aos aminoglicosídeos entre 7-50%, bem como à nitrofurantoína (21%) e fosfomicina (14%).

Estes dados sugerem que os plasmídios portadores dos genes ESBLs arrastam consigo os genes de resistência às diferentes famílias de antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, comportando-se assim como estirpes multiresistentes (MDR) (Falagas, et al., 2010, Sanchez, et al., 2014, Farinãs e Martínez-Martínez, 2013, Pallet e Hand, H., 2010 Rogers, et al., 2010, Oteo, et al., 2010).

Nos isolados de *E. coli* produtores de qAmpC a resistência aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos não foi tão relevante, sendo nula a resistência à amicacina, nitrofurantoína e fosfomicina (Sanchez, et al., 2014, Falagas, et al., 2010, Freitas, F., et al., 2013).

A emergência de estirpes uropatogênicas de *E. coli* produtoras de ESBLs e qAmpC com importante resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, bem como às quinolonas e aos outros grupos de antibióticos, reduz substancialmente as opções terapêuticas no tratamento de UTI e evidencia o insucesso da utilização empírica destes etiotropos (Oteo, et al., 2010, Falagas, et al., 2010, Sanchez, et al., 2014, Farinãs e Martínez-Martínez, 2013, Pallet e Hand, H., 2010 Rogers, et al., 2010)

Entende-se que a fosfomicina, dada as suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas, representa uma boa alternativa para o tratamento da UTI .

Nos casos de UTI com grande gravidade, os carbapenemos constituem a melhor opção, tendo este estudo mostrado a ausência de isolados uropatogênicos de *E. coli* produtoras de carbapenemases.

## VI. CONCLUSÃO

As conclusões obtidas com a realização deste trabalho são:

- A *E. coli* é o principal agente etiológico de ITU na comunidade;
- A população feminina é a que apresenta maior ocorrência de ITU, sendo mais frequente na classe etária dos 61 aos 75 anos em ambos os gêneros;
- Na avaliação da suscetibilidade aos antibióticos de eliminação urinária utilizados no tratamento de ITU, verificou-se uma elevada taxa de resistência à ampicilina, ao ácido nalidixico e ao trimetopim-sulfametoxazol. A baixa taxa de resistência à nitrofurantoína e à fosfomicina representa uma boa alternativa terapêutica no tratamento de ITU;
- Entre os isolados de *E. coli* estudados foram identificados isolados produtores de ESBLs e qAmpC expressando resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, bem como a outros grupos de antibióticos, comportando-se como isolados multirresistentes.

A disseminação de bactérias na comunidade, nomeadamente de *E. coli*, que expressam vários mecanismos de resistência é uma realidade preocupante, limitando a escolha do antibiótico e contribuindo para o insucesso do tratamento da ITU.

O conhecimento da realidade epidemiológica e dos padrões de suscetibilidade aos vários antibióticos utilizados no tratamento de ITU é de extrema importância, permitindo assim a escolha mais adequada da terapêutica empírica.

Deverão ser realizados periodicamente estudos que permitam um conhecimento atualizado das principais estirpes associadas a ITU, dos padrões de suscetibilidade, bem como dos mecanismos de resistência expressos pela estirpe, de forma a prevenir a emergência e disseminação de bactérias multirresistentes na comunidade.

## VII. Bibliografia

Agarwal, J., Srivastana, S., Singh, M., (2012). Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*, *Journal of Medical Microbiology*, vol 30, pag 141-149

Ambler, R. P., (1980). The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical transactions of the royal society of London. Series B, Biological sciences*, 289 (1036), pp. 321-31.

Andreu, A., et al. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinário, *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clínica*, 29 (1):55-57

Barroso, H., Silvestre, A., Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica*, volume 1, Editora Lidel, ISBN 978-989-752-057-0.

Bonnet, R., (2004), Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M Enzymes, *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (1): 1-4.

Bush, K., Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (3), pp. 969-76.

Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39 (6), pp. 1211-33.

Bradford, P., (2001) Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in 21st century: Characterization Epidemiology and Detection of this Importante Resistance Threat, *Clinical Microbiology Reviews*, 933-951

Brown, N., et al., (2010), Multiple global suppressors of protein stability defects facilitate the evolution of extended-spectrum TEM  $\beta$ -lactmases, *J. Mol. Biol.*, 404(5):832-846.

Campos,T., Mendes, P., Maio,J., (2006). Infecção urinária na criança, *Acta Urológica*, 23; 4:19-23

Cantón, R., González-Alba, J., Galán, J., (2012) CTX-M enzymes: origin and diffusion, *Frontiers in Microbiology*, vol 3 article 110

Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., *et alli.*, (2012), Rapid Evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe, *Clinical Microbiology and Infection*, 18, pp 413-431.

Cantón, R., (2010), Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica, *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, vol. 28 (6), pp. 375 - 378.

Cantón, R., *et al.*, (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), pp. 144-53.

Cantón, R., Coque, T., (2006). The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9 (5), pp. 466-75.

Cantón, R., Coque, T. M., Baquero, F. (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16 (4), pp. 315-25.

Cantón, R., Coque, T., (2006), The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic, *Current Option in Microbiology*, 9:466-475

Cattoir, V., Nordmann, P. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 16 (8), pp.1028-46. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011, Surveillance Report, ISBN-978-92-9193-398-3.

Cercenado, E., Cantón, R., (2010). Procedimientos en Microbiología Clínica 14 a. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Coque, T., Baquero, F., Cantón, R., (2008), Increasing Prevalence os ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, *Eurosurveillance*, vol 13.

Cornaglia, G., Garau, J., Livermore, D. (2008). Living with ESBLs Introduction, *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 1: 1-2.

Correia, C., *et al.* (2007). Etiologia das Infecções do Tracto Urinário e sua Susceptibilidade aos Antimicrobianos. *Acta Med Por*, 20: 543-549.

Chug, A., Arianayagam, M., Rashid, P., (2010). Bacterial cystitis in Women, *Australian Family Physician* vol 39, nº5 May.

D'Andrea, M., *et alli.*, (2013), CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance, *International Journal of Medical Microbiology*.

Drieux, L., *et al.*, (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (5), pp. 21-4.

Evans, B., Amyes, S., (2014), OXA  $\beta$ -lactamases, *Clinical Microbiology Reviews*, 241-263

Falagas, M. E. *et al.*, (2010). Fosfomycin versus other antibiotics for the treatment of cystitis: a meta-analysis of randomized controller trials. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 1862-1877.

Falagas, M. E. *et al.*, (2008). Fosfomycin: use be young urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin. Infect. Dis.* 46:1069-77

Ferreira, W., Sousa, J.C. (2000). *Microbiologia*, volume 2, Editora Lidel, ISBN 978-972-757-112-3

Ferreira, W., Sousa, J.C. (1998). *Microbiologia*, volume I, Editora Lidel, ISBN 972-757-024-0

Fonseca, A., *et al.*, (2004), Orientações para elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia, *Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*, Programa Nacional de controlo de Infeção

Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. (2007). *Bailey & Scott's Diagnostics Microbiology*, Mosby Elsevier, Twelfth Edition.

Fuda, C., *et al.* (2004). The Basis for resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (39), pp.408026

Garcia-Vázquez, E., *et alli.*, (2011), Bacteriemias por *Escherichia coli* produtoras de betalactamases de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales, *Res. Esp. Quimioter.* 24 (2):57-66.

Giedraitiene, A., *et al.*, (2011), Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria, *Medicina (Kaunas)*, vol. 47 (3), pp. 137 – 146

Giske, C., *et al.*, (2013) EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/ or epidemiology importance, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Version 1.0.

Gobernda, M., Cruz, F. (2002). Procedimentos en Microbiología Clínica 14. La Infección urinaria. Recomendaciones de la Sociedade Española de Enfermedades.

Goossens, H., *et al.*, (2005), Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 365 (9459), pp. 579-87.

Hawkey, P., Jones, A., (2009), The changing epidemiology of resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64 suppl. 1, i3-i10.

Hendin, D. *et al.*, (1969) Phosphomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science*. 166: 122-23

Jacoby, G., Bush, K., (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54 (3):969-76

Jacoby, G., (2009), AmpC  $\beta$ -lactamases, *Clinical Microbiology Reviews*, 161-182

Jones, G. L. *et alli.*, (2008). Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (6), pp. 1245-51.

Kahlmeter, G (2003) An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS Project, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol 51: 69-76.

Kaneko, K., *et alli.*, (2005), Gene Mutations Responsible for Overexpression of AmpC  $\beta$ -lactamase in Some Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae*, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6): 2955-2958.

Livermore, D., (2008). Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clinic Microbiol Infect*, 14, pp.3-10

Livermore, D. M., *et al.*, (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (2), pp. 165-74.

Lloyd, A., Rasko, D., Mobley, H., (2007). Defining Genomic Islands and Uropathogen-Specific Genes in Uropathogenic *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 189 (9): 3532-3546

Lowy, F., Gordon, R., (2008) Pathogenesis of Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Supplement Article*, 46 (Suppl 5)

Marques, N., Araújo, F., Soares, J. (2005). Infecções e Antibioterapia num Serviço de Medicina, *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*, vol 12 nº4.

Martins, F., Vitorino, J., Abreu, A., (2010). Avaliação do Perfil de Susceptibilidade aos antimicrobianos de Microrganismos isolados em urinas na região do Vale do Sousa e Tâmega. *Acta Medica Portuguesa*, 23: 641-646

Mendo, A., *et al.*, (2008), Frequência de Infecções Urinárias em Ambulatório – dados de um laboratório de Lisboa. Parte I, *Revista Lusófona de ciências e tecnologia da Saúde*, (5) 2: 216-223

Machado, E., *et al.*, (2013), Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal, *Frontiers in Microbiology*, 4:80.

Machado, E. *et alli.*, (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, wich encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (9), pp. 3220-1.

Machado, E., *et alli.*, (2005), Integron contente of extended spectrum beta lactamses-producing *E colli* strais over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1823-1829.

Mendonça, N., *et al.*, (2007), Spread of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1946-1955.

Meireles, B., *et al.*, (2006), A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC-  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(6), pp 370-2

Navarro, F., Miró, E., Mirelis, B., (2010), Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (9): 638-645.

Nordmann, P., Dortet, L., Poirel, L., (2012), Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm, *Trends in Molecular Medicine* pp1-10

Novais, A. *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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (2), pp. 825-34.

Novais, A. *et al.*, (2006). Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from *Tn402* located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- $\alpha$ , and IncFI groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (8), 2741-50.

Narciso, A., *et al.* (2010). *Escherichia coli* Uropatógena: Resistência aos Antibióticos Versus Fatores de Virulência. *Acta Urol.*, 27; 2:11-20.

Narciso, A., *et al.* (2012). Infecções urinárias na comunidade: estudo multicêntrico, *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, vol. 8; Janeiro-Abril, pp 7-12.

Nichol, K. A., Zhanel, G. G., Hoban, D. J., (2002). Penicillin-binding protein 1A, 2B, and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (10), pp. 326-64

Nikaido, H., (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, pp. 8-28.

Nordstrom, L., Liu, C., Price, L., (2013). Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. *Frontiers in Microbiology*, 4:29.

Oteo, J., *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.

Paterson, D., Bonomo, R., (2005), Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical Update, *Clinical Microbiology Reviews*, vol 18, n<sup>o</sup>4, 657-686.

Petrosino, J., Pendleton, A., Weiner, J., *et al.*, (2002), Chromosomal System for Studying AmpC-Mediated  $\beta$ -lactam Resistance Mutation in *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother*, 46(5), pp1535-1539.

Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G., (2002), Plasmid-Determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, pp 1-11

Pitout, J., (2012). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Frontier Microbiology*, 19; 3:9

Pitout, J., *et al.*, (2005). Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp.52-59

Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., (2010), Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother.*, 54(1): 24:38

Poole, K., (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 20-51

Poole, K., (2004). Resistance to  $\beta$  – lactam antibiotics. *Cellular and Molecular life Sciences*, 61, pp.2200-23.

Popovic, M., *et al.*, (2010). Fosfomicin: an old, new friend? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 29, pp. 127 - 142.

Queenan, A., Bush, K., (2007), Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases, *Clinical Microbiology Reviews*, pp440-458

Raghunath, D. (2008), Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India. *J. Biosci*, vol. 33 (4), pp. 593 – 603

Reeves DS (1994). Fosfomicin trometamol. *J Antimicrob Chemother* 34: 853-858.

Risueño, F. N., Cardona, E. M., Otero, B. M., (2010), Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 20 (5), pp. 225-34.

Robicsek, A., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 6 (10), pp. 629-40

Rodloff, A., *et al.*, (2008), Susceptible, Intermediate; and Resistant - The Intensity of Antibiotic Action. *Deutsches Arzteblatt International*, vol. 105 (39), pp. 657 – 662

Rodrigues, F., Barroso, A., (2011). Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 29 (2): 123-131

Rolo, F., Parada, B., Moreira, P. (2008). Cistite não complicada na mulher. *Guia multidisciplinar reconhecido pela Associação Portuguesa de Urologia*.

Roussos, N., *et al.*, (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.

Ryoo, N. H., *et al.* (2005). Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp.698-702.

Saier, M. H. Jr., (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (2), pp. 354-411.

Saravolatz, L., *et al.*, (2011). Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases*, 52, pp. 1156-1163.

Schor, N., Heilberg, I., (2003). Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário. *Revista Assoc Med Bras*, 49: 109-16

Seely, R., Stephens, T., Tate, P., (1995). *Anatomia & Fisiologia*, Lusodidactica, Terceira Edição.

Soriano-García, F., (2010). Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la lectura interpretada del antibiograma, *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clínica*, vol. 28 (7), pp. 461 – 466

Sousa, J. C. (2006). Manual de Antibióticos Antibacterianos, 2ª Edição. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa IBSN 972-8830-49-1

Strahilevitz, J. *et alli.*, (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (4), pp. 664-89.

Suárez, C., Gudiol, F., (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clínica*, 27(2), pp.116-29

Takahata, S., *et al.*, (2010). Molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 35: 333-337.

Williams, J. D., (1999),  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactmases inhibitors, *Journal of Antimicrobial Agents*, 12:3-7.

Wright, K., Hultgren, S., (2006). Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiol*,1 (1), pp 75-87.

[http://www.webciencia.com/11\\_25excretor.htm](http://www.webciencia.com/11_25excretor.htm)

[http://aulavirtual.usual.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidade/document/uni\\_02/57/caphtm/cap0401.htm](http://aulavirtual.usual.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidade/document/uni_02/57/caphtm/cap0401.htm)

<http://lahely.org/studies>