



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

MAYANA LOPES ARAUJO

**Genotipagem de β -lactamases de espectro estendido
(ESBL) em cepas de *Escherichia coli* uropatogênica
isoladas de pacientes no Hospital Regional de Ceilândia**

Brasília, DF

2017

MAYANA LOPES ARAUJO

Genotipagem de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) em cepas de *Escherichia coli* uropatogênica isoladas de pacientes no Hospital Regional de Ceilândia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Professor Dr. Alex Leite Pereira

Brasília, DF

2017

MAYANA LOPES ARAUJO

**Genotipagem de β -lactamases de espectro estendido
(ESBL) em cepas de *Escherichia coli* uropatogênica
isoladas de pacientes no Hospital Regional de Ceilândia**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^o. Dr^o. Alex Leite Pereira
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a. Larissa Fernandes Matos
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a Daniela Castilho Orsi
(FCE/Universidade de Brasília)

Brasília, DF

2017

Aos meus amados pais, Sergino e Concita.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me protegeu e me deu força para superar as dificuldades e conseguir chegar onde estou. Sem Ele eu nada seria.

Aos meus pais, pelo amor, paciência e por me ensinar a não desistir dos meus sonhos. Agradeço a minha mãe Concita, por sempre apoiar minhas decisões, por ser minha melhor amiga e conselheira. Agradeço o meu pai, Sergino, que não mediu esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiante.

As minhas irmãs, Larissa e Laiana, pelo apoio, carinho e por sempre me proporcionar momentos de alegria nas horas difíceis.

Aos meus tios Carlos, Roberto e Margarida, por confiarem em mim e estarem do meu lado em todos os momentos da vida.

Ao meu orientador Alex Leite Pereira, pela paciência, ensinamentos e por me conceder a oportunidade de trabalhar com sua equipe. Admiro seu trabalho e sua humildade. Você me inspira a continuar na área de microbiologia.

Agradeço as minhas queridas companheiras do “Lab Micro”, Danielly, Flaviane, Pâmela, Lorena, Fabiana e Érica, por toda a ajuda e pela amizade.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A infecção do trato urinário (ITU) é a infecção bacteriana mais comum em humanos. O principal patógeno bacteriano isolado de ITUs é *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC). β -lactâmicos como penicilinas semissintéticas (ampicilina e amoxicilina), monobactams e cefalosporinas são antibióticos frequentemente utilizados no tratamento de ITUs. No entanto, a emergência de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) tem limitado o uso de β -lactâmicos. ESBL são enzimas bacterianas capazes de hidrolisar penicilinas, monobactams e cefalosporinas até a 3ª geração. A presença dessas enzimas em cepas de UPEC resulta em frequente falha terapêutica associada ao uso empírico de β -lactâmicos. O objetivo desse trabalho foi determinar o perfil genético associado a ESBL em cepas de *E. coli* isoladas de ITUs atendidas no Hospital Regional de Ceilândia. As cepas com identificação presumível para a produção de ESBL foram semeadas em meio cromogênico para a confirmação da produção de ESBL. Foram testados 4 genes de ESBL (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SVH}) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Também foi realizado teste de susceptibilidade a antimicrobianos. O meio cromogênico para a detecção de ESBL apresentou resultados falso-negativos. Comumente as cepas de UPEC apresentaram combinações de genes ESBL, sendo o genótipo *bla*_{CTX-M-1}⁺ / *bla*_{CTX-M-3}⁺ a combinação mais frequente (68,9%). As cepas de UPEC produtoras de ESBL apresentaram alta frequência de resistência a outras classes de antibióticos também utilizados para tratar ITU como fluoroquinolonas (ciprofloxacino – 84,3%- e norfloxacino – 84,3 %).

Palavras-chave: *Escherichia coli* uropatogênica, beta lactamases de espectro estendido, genotipagem

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI) is the most common bacterial infection in humans. The main bacterial pathogen isolated from UTIs is uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). β -lactams such as semisynthetic penicillin (ampicillin and amoxicillin), monobactam and cephalosporins are frequently used antibiotics for treating UTIs. However, the emergence of extended spectrum lactamases (ESBL) have limited the usage of β -lactams. ESBLs are bacterial enzymes capable of hydrolyzing penicillins, monobactams and cephalosporins up to those from the 3rd generation. The presence of these enzymes in UPEC strains frequently result in therapeutic failure associated with the empirical use of β -lactams. Therefore, the goal of this study aimed to define the ESBL-associated genotypes in strains of *E. coli* isolated from patients with UTIs treated in the Regional Hospital of Ceilândia. Strains with presumed production of ESBL were grown on chromogenic medium for confirming the production of ESBL. Four ESBL genes (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SVH}) were tested by means of the polymerase chain reaction (PCR). Moreover, antimicrobial susceptibility tests were also performed. The chromogenic medium for the detection of ESBL presented false-negative results. UPEC strains commonly showed combinations of ESBL genes, and the genotype *bla*_{CTX-M-1}⁺ / *bla*_{CTX-M-3}⁺ was the most frequent gene combination detected (68, 9%). Finally, ESBL-producing UPEC strains showed high frequency of resistance to other classes of antibiotics also used for treating ITUs such as fluoroquinolones (ciprofloxacin – 84,3%- and norfloxacin – 84,3%).

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli*, extended spectrum beta lactamase, genotyping

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICO	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	10
1.INTRODUÇÃO	11
2.JUSTIFICATIVA	16
3.OBJETIVO	16
3.1.Objetivo geral.....	16
3.2.Objetivos específicos.....	16
4.METODOLOGIA	17
4.1.Cepas de <i>E. coli</i> uropatogênica (UPEC).....	17
4.2.Deteccão de cepas de <i>E. coli</i> multirresistentes produtoras de ESBL.....	17
4.3.Ensaio de PCR para deteccão de genes de ESBL (CTX-M, TEM e SVH).....	17
4.4.Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	18
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6.CONCLUSÃO	25
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Estruturas dos diferentes grupos de antibióticos β -lactâmicos.

Figura 2. Hidrólise do anel β -lactâmico por β -lactamase.

Figura 3. Demonstração das cepas semeadas em meio cromogênico para detecção de ESBL.

Figura 4. Fluxograma de análises e resultados envolvendo as cepas de UPEC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para detecção de genes ESBL.

Tabela 2. Antibióticos de série urinária.

Tabela 3. Frequência de resistência das cepas produtoras de ESBL.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSCI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CTX-M - Cefotaxima

DAEC - *Escherichia coli* adesão difusa

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ESBL - β -lactamase de espectro estendido

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

HRC - Hospital Regional da Ceilândia

ITU - Infecção do trato urinário

LB - Luria Broth

mL - mililitro

PBP - Proteína ligadora de penicilina

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

SHV - Sulfidril variável

TEM - Temoniera

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

μ L - microlitro

1. INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é a infecção bacteriana mais comum em humanos, afetando qualquer faixa etária e em ambos os sexos, tanto em pacientes ambulatoriais quanto hospitalizados (O'BRIEN, 2016; STAPLETON, 2014). As ITUs possuem maior incidência em mulheres do que em homens devido a fatores anatômicos, como proximidade entre a vagina e o ânus e menor comprimento da uretra, o que facilita a ascensão das bactérias da uretra para a bexiga (FOXMAN, 2014). A ITU também ocorre com frequência em crianças e em idosos (O'BRIEN, 2016; GEERLINGS, 2016). Em crianças, a ITU pode estar associada a malformações congênitas e hábitos higiênicos (BHAT; KATY; PLACE, 2011). Os idosos apresentam vários fatores de risco para o aparecimento de ITU, como baixa imunidade, hospitalizações e doenças crônicas (NICOLLE, 2009; STAPLETON, 2014).

ITUs podem afetar qualquer parte do trato urinário (KUMAR, 2015). A ITU geralmente é classificada em complicada e não complicada. ITU complicada envolve alterações estruturais ou funcionais do trato urinário, comorbidades médicas, hospitalização ou resistência ao tratamento antibacteriano. Por sua vez, na ITU não complicada não ocorre alterações estruturais ou funcionais do trato urinário e não há comprometimento da função renal (STAPLETON, 2014). Anatomicamente, a ITU pode ser classificada em cistite, quando a inflamação ocorre no trato urinário inferior, acometendo uretra e bexiga; e pielonefrite quando ocorre processo infeccioso do trato urinário superior, ou seja, ureteres e rins. (HOOTON; STAMM, 1997; SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

A *Escherichia coli*, é o agente etiológico mais comumente isolado de ITUs, correspondendo por cerca de 80% de todos os casos (ROSEN; KLUMPP, 2014). No entanto, outras espécies bacterianas podem estar envolvidas com casos de ITU, dentre as quais podemos citar *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus saprophyticus* (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015; FOXMAN, 2014; VALIQUETTE, 2001).

E. coli é um bacilo Gram negativo, que atua como um organismo comensal primariamente restrito no lúmen intestinal. Porém, existem cepas de *E. coli* que

acumulam fatores de virulência permitindo-as causar infecções intestinais e extra intestinais. (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Cepas de *E. coli* que causam infecções intestinais são classificadas em seis patotipos diferentes: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (ABE *et al.*, 2008; BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012). As cepas de *E. coli* extra intestinais frequentemente são associadas com ITUs e são classificadas como *E. coli* uropatogênica (UPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; ABE *et al.*, 2008).

O tratamento de ITUs envolve o uso de diferentes classes de antimicrobianos, tais como sulfonamida, aminoglicosídeos, β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina e nitrofurantoína. Na escolha do antimicrobiano considera-se o agente etiológico envolvido, fatores específicos do paciente, como o local anatômico da infecção, gravidade da doença, princípios farmacocinéticos e farmacodinâmico e custo. Além disso, a escolha do antimicrobiano deve ser baseada em padrões de resistência local (HEILBERG; SCHOR, 2003; BADER; HAWBOLDT; BROOKS, 2010).

Os β -lactâmicos são os antimicrobianos mais utilizados no mundo (CHO; UEHARA; BERNHARDT, 2014). A penicilina foi o primeiro antibiótico β -lactâmico descoberto. Tal substância é secretada pelo fungo *Penicillium notatum* e foi descoberta acidentalmente em 1928 por, Alexander Fleming (ESSACK, 2001; BIONDI *et al.*, 2011). Desde a descoberta da penicilina diversos β -lactâmicos foram descritos, uma vez que a sua atividade pode ser ampliada por manipulação química (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). O grupo dos β -lactâmicos possui em seu núcleo estrutural o anel β -lactâmico. A ligação de um radical no anel β -lactâmico, determina a atividade de um composto em particular. Sendo assim, os β -lactâmicos são divididos em quatro grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems (figura 1) (ESSACK, 2001; BIONDI *et al.*, 2011).

Os β -lactâmicos inibem a etapa final na síntese da parede celular bacteriana ao inibir as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que são responsáveis pela transpeptidação do peptidoglicano (CHO; UEHARA; BERNHARDT, 2014). O peptidoglicano é um componente da parede celular de bactérias, que confere rigidez

estrutural, contribuindo para a manutenção de uma forma celular definida e preservação da integridade celular. O peptidoglicano é formado por cadeias lineares de glicano ligadas entre si por tetrapeptídios curtos, formando ligações cruzadas (transpeptidação). As cadeias de glicano são constituídas por carboidratos alternados de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico em ligação β -1,4. Os tetrapeptídios curtos, geralmente são constituídos de cadeias curtas de D e L-aminoácidos ligados aos resíduos de ácido N-acetilmurâmico. As reações de ligações peptídicas cruzadas são catalisadas pelas PBPs, que atuam como transpeptidases para a síntese do peptidoglicano (VOLLMER *et al*, 2008; FRÈRE; PAGE, 2014). Sendo assim, a ação de β -lactâmicos promove a perda de integridade da parede celular e lise da célula (CHO; UEHARA; BERNHARDT, 2014).

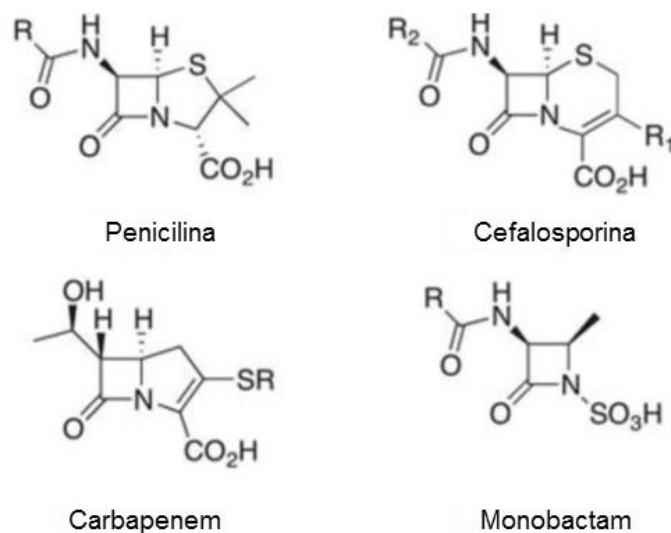


Figura 1. Estruturas dos diferentes grupos de antibióticos β -lactâmicos. (WORTHINGTON; MELANDER, 2013)

Ampicilina, amoxicilina, monobactam e cefalosporinas são os β -lactâmicos usualmente utilizados para tratar ITU causada por UPEC, devido a sua eficácia e segurança. Porém, em meados da década de 1980, o tratamento ficou limitado devido

a emergência de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) na espécie *E. coli* (HĚLKOVÁ et al., 2014; LIVERMORE; WOODFORD, 2006). ESBL são enzimas bacterianas capazes de inativar os antibióticos β -lactâmicos por hidrólise (figura 2). Tais enzimas têm a capacidade de hidrolisar penicilinas, monobactams e cefalosporinas até a 3ª geração. Grande parte de cepas de enterobactérias portando ESBL (88%) promovem hidrólise de cefalosporinas de 4ª geração (Cefepime) (DA SILVA et al, 2011). Em contrapartida, enzimas do tipo ESBL não hidrolisam carbapenems. (PITOUT, et al., 2005; PITOUT, 2008). O uso de inibidores de β -lactamases (tazobactam, sulbactam e clavulanato) em associação com os β -lactâmicos permite que a atividade do antibiótico seja retomada, permitindo o seu uso clínico (WILLIAMS, 1999).

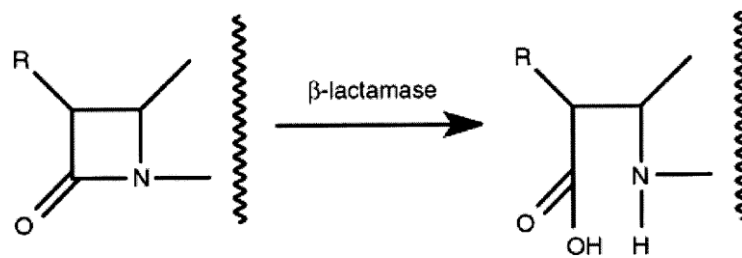


Figura 2. Hidrólise do anel β -lactâmico por β -lactamase. (WILLIAMS, 1999).

As principais famílias de enzimas produtoras de ESBL presentes em *E. coli* são SHV, TEM e CTX-M (ZHANG et al., 2015; DHILLON; CLARK, 2011). Os genes que codificam estas enzimas geralmente estão em plasmídeos conjugativos, como também, podem estar posicionados no cromossomo (DHILLON; CLARK, 2011).

A SHV, ou Sulfidril Variável é uma enzima codificada por plasmídeo, universalmente encontrada em *Klebsiella pneumoniae*. A SHV-1 foi a primeira enzima da classe a ser descoberta que confere resistência à penicilinas de amplo espectro, tais como ampicilina, ticarcilina e piperacilina. Em 1983, foi isolado a SHV-2, derivado de uma mutação no SHV-1, que hidrolisava eficientemente a cefotaxima (3ª geração) e, em menor grau, a ceftazidima (3ª geração) (PATERSON; BONOMO, 2005; GUPTA, 2007).

TEM foi relatado pela primeira vez em 1965 de uma *E. coli* de um paciente em Atenas, Grécia, chamado Temoniera (daí a nomeação TEM). TEM-1 é capaz de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração. A primeira variante TEM com atividade aumentada contra cefalosporinas de espectro alargado foi denominada TEM-3 (PATERSON; BONOMO, 2005; GUPTA, 2007).

Em 1990, na Alemanha, foi identificada uma enzima que não pertencia as famílias TEM ou SHV, denominada de CTX-M-1. As enzimas CTX-M (em alusão à cefotaxima) apresentam uma potente atividade hidrolítica contra cefotaxima. Além disso, são melhores inibidas pelo inibidor de β -lactamase tazobactam do que pelo sulbactam e clavulanato. Sua origem está relacionada a mutação de β -lactamase cromossômica de *Kluyvera spp.* CTX-M tornou-se a mais prevalente das ESBL, tanto em ambiente nosocomial tanto na comunidade. Sua disseminação tem sido associada a diferentes alelos, principalmente o CTX-M-15, o que tem contribuído para o atual cenário de pandemia desta família de β -lactamase (PATERSON; BONOMO, 2005; POURNARAS, *et al.*, 2006; GUPTA, 2007; LINCOPAN, 2012).

Em 1995, Bush *et al.*, propôs a classificação de β -lactamases baseada nas características funcionais das enzimas. As enzimas foram classificadas com base na sua capacidade de hidrolisar classes específicas de β -lactâmicos e nas propriedades de inativação dos inibidores de β -lactamases. As ESBL pertencem ao grupo 2, subclasse “b”, capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas (BUSH *et al.*, 1995; BUSH; JACOBY, 2010).

O uso excessivo de antibióticos em ambiente hospitalar tem ocasionado a seleção e emergência de cepas de UPEC multirresistentes. Cepas de UPEC produtoras de ESBL são um problema clínico importante, pois provocam falhas no tratamento e limitam as opções de terapia medicamentosa, uma vez que pode ocorrer resistência associada a outras classes de antibióticos (HĚLKOVÁ *et al.*, 2014).

Este trabalho propôs estabelecer a frequência de genótipos associados a ESBL e o perfil de susceptibilidade em cepas de UPEC positivas para ESBL recuperadas de ITUs atendidas no Hospital Regional de Ceilândia (HRC).

2. JUSTIFICATIVA

E. coli é o principal agente etiológico de infecção do trato urinário em humanos. Não obstante, o uso demasiado de antibióticos em ambiente hospitalar tem ocasionado a seleção e emergência de cepas de *E. coli* multirresistentes. Cepas de UPEC produtoras de ESBL produzem infecções multirresistentes e de difícil manejo com considerável impacto clínico. O conhecimento sobre perfis genéticos associados a ESBL pode revelar a circulação endêmica de genes previamente associados com a dispersão epidêmica de ESBL.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é determinar a frequência de cepas de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) em infecções do trato urinário atendidos no Hospital Regional de Ceilândia (HRC).

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a produção de ESBL em meio cromogênico (chromID® ESBL).
- Identificar o perfil de genes ESBL (CTX-M, TEM e SHV).
- Detectar o perfil de resistência a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e carbapenêmicos em cepas produtoras de ESBL.

4. METODOLOGIA

4.1. Cepas de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)

As 85 cepas analisadas pertencem a uma coleção de 375 isolados de UPEC recuperados de infecções extra intestinais atendidas no Hospital Regional de Ceilândia (HRC) no Distrito Federal. As culturas foram realizadas no Laboratório de Emergência (Microbiologia) do HRC para fins de diagnóstico por solicitação médica. A identificação e o perfil de susceptibilidade a antibióticos dos isolados de *E. coli* foram feitos no HRC utilizando o sistema automatizado MicroScan WalkAway®. Os isolados de *E. coli* recuperados no HRC foram preservados em meio de cultura (ágar nutriente) e encaminhados aos laboratórios da Faculdade de Ceilândia (FCE/UnB) para a realização da caracterização molecular.

4.2. Detecção de cepas de *E. coli* multirresistentes produtoras de ESBL

Isolados de *E. coli* com identificação presumível para produção de ESBL (prova de susceptibilidade Cefotaxima/Clavulanato ou Ceftazidima/Clavulanato positivas) foram recuperados dos estoques em meio Luria Broth (LB) e incubados a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Cinco microlitros das culturas em LB foram adsorvidas na superfície de meio cromogênico para detecção de ESBL (chromID ESBL BioMerieux). Após 24h de incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$, as culturas que apresentaram bom crescimento com colônias de tom vermelho/magenta foram consideradas produtoras de ESBL.

4.3. Ensaio de PCR para detecção de genes de ESBL (CTX-M, TEM e SVH)

A detecção de genes de ESBL foi realizada por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR). Para extração do DNA, coletou-se uma colônia com o auxílio de uma alça calibrada de 10 μL , para ressuspensão em 500 μL de água deionizada. Em seguida, a amostra foi homogeneizada em um agitador tipo vortex. A suspensão foi colocada em banho-maria a 100°C por 15 minutos e centrifugada (11.000 rpm/3 min). O sobrenadante foi utilizado como fonte de DNA total para as reações de amplificação. A solução de amplificação era composta por água deionizada, tampão de PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 a 25°C ; KCl 500 mM; 0,01% de gelatina), desoxinucleotídeos trifosfatos 25 mM, pares de *primers* de interesse (concentração final de 10 μM) e enzima Taq DNA polimerase (1 U por reação). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1% tampão acetato pH 8,2). Em seguida

foram corados com brometo de etídio e visualizados por transiluminação de luz UV.

Os primers utilizados para a detecção de genes de ESBL (CTX-M, TEM e SHV) estão descritos na Tabela 1. Foi utilizado como controle positivo para ESBL a cepa de *Klebsiella pneumoniae* IOC-Fiocruz CCBH 4955. Como controle negativo foi utilizada uma cepa da própria coleção de isolados de UPEC apresentando susceptibilidade a todos os β -lactâmicos testados e com resultado negativo para presunção de ESBL (prova de susceptibilidade Cefotaxima/Clavulanato ou Ceftazidima/Clavulanato).

Tabela 1. Primers utilizados para detecção de genes de ESBL.

Gene	Sequência dos primers (5'-3')	Fragmento esperado (pb)	Temp. de anelamento
<i>TEM</i>	TGCCCCGCATACACTATTCTCAGAAT ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	445	59°C
<i>SHV</i>	CGCCTGTGTATTATCTCCCT CGAGTAGTCCACCAGATCCT	294	57°C
<i>CTXM-1</i>	GACGATGTCACTGGCTGAGC AGCCGCCGACGCTAATACA	499	59°C
<i>CTXM-3</i>	CGCTTTGCCATGTGCAGCACC GTCCAGTACGATCGAGCC	307	61°C

4.4. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Isolados de *E. coli* que apresentaram crescimento em meio cromogênico para detecção de ESBL (chromID ESBL BioMerieux) foram recuperados dos estoques em meio LB e incubados a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. As culturas bacterianas foram repicadas em novo meio LB e incubados a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 18 horas. As diluições de cada cultura foram preparadas em solução salina fisiológica até que a turbidez das suspensões se ajustassem para 0,5 da escala de turbidez de McFarland. Cada cultura foi semeada

com swab estéril em ágar Mueller-Hinton (placa 150x20mm) em diferentes sentidos, propiciando uma semeadura uniforme. Com auxílio de uma pinça estéril o suporte contendo 15 antibióticos de série urinária (tabela 2) foi colocado sobre a superfície do inóculo em placa de ágar Mueller-Hinton. As amostras foram incubadas por 18 a 24 horas a 36 ± 1 °C. Foi medido o diâmetro total da zona de inibição em milímetros. Os resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram interpretados como sensível, intermediário ou resistente baseados nos pontos de corte do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2016.

Tabela 2. Antibióticos de série urinária.

<i>Antibiótico</i>	<i>Código/potência</i>
AMINOGLICOSÍDEO	
<i>Amicacina</i>	AMI 30
<i>Gentamicina</i>	GEN 10
CARBAPENEM	
<i>Meropenem</i>	MPM 10
CEFALOSPORINA	
<i>Cefazolina</i>	CFZ 10
<i>Ceftriaxona</i>	CRO 30
<i>Cefepime</i>	CPM 30
PENICILINA	
<i>Amoxicilina/Ac.</i>	AMC 30
<i>Ampicilina</i>	AMP 10
FLUOROQUINOLONA	
<i>Ácido nalidíxico</i>	NAL 30
<i>Ciprofloxacina</i>	CIP 05
<i>Levofloxacina</i>	LEV 05
<i>Norfloxacina</i>	NOR 10
SULFONAMIDA	
<i>Sulfazotrim</i>	SUT 25
TETRACICLINA	
<i>Tetraciclina</i>	TET 30
NITROFURANO	
<i>Nitrofurantoína</i>	NIT 300

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Detecção de cepas produtoras de ESBL

Em meio a uma coleção de 375 cepas de UPEC, 85 (22,7%) cepas apresentaram identificação presumível para produção de ESBL (prova de susceptibilidade Cefotaxima/Clavulanato ou Ceftazidima/Clavulanato positivas - sistema automatizado MicroScan WalkAway®). Tais cepas, antes preservadas em ágar nutriente, foram recuperadas em caldo LB, 76 cepas (89,4%) apresentaram crescimento bacteriano no passo de recuperação em LB. Estas cepas foram semeadas em meio cromogênico para detecção de ESBL (chromID ESBL BioMerieux) (figura 3). Cinquenta e seis cepas (73,7%), foram positivas para produção de ESBL e 20 cepas (19,6%) foram negativas para produção de ESBL. Nas cepas positivas para ESBL em meio cromogênico, foram detectados genes para ESBL em 45 cepas (80,4%). No grupo de cepas que não apresentaram crescimento em meio cromogênico para ESBL, 13 das 20 cepas (65%) apresentaram resultados positivos para detecção de genes ESBL, demonstrando a sensibilidade falha do método, se comparado ao método automatizado MicroScan WalkAway® para a detecção de cepas portando os genes ESBL, aumentando a possibilidade de ocorrência de resultados falsos-negativo (figura 4).

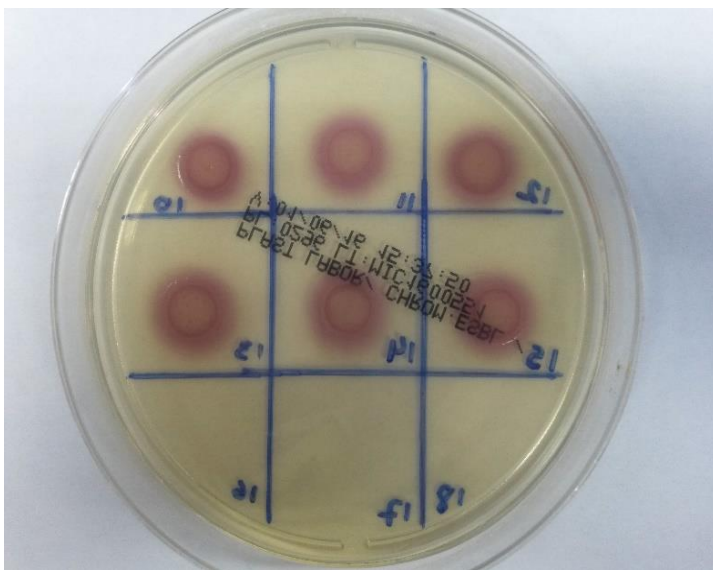
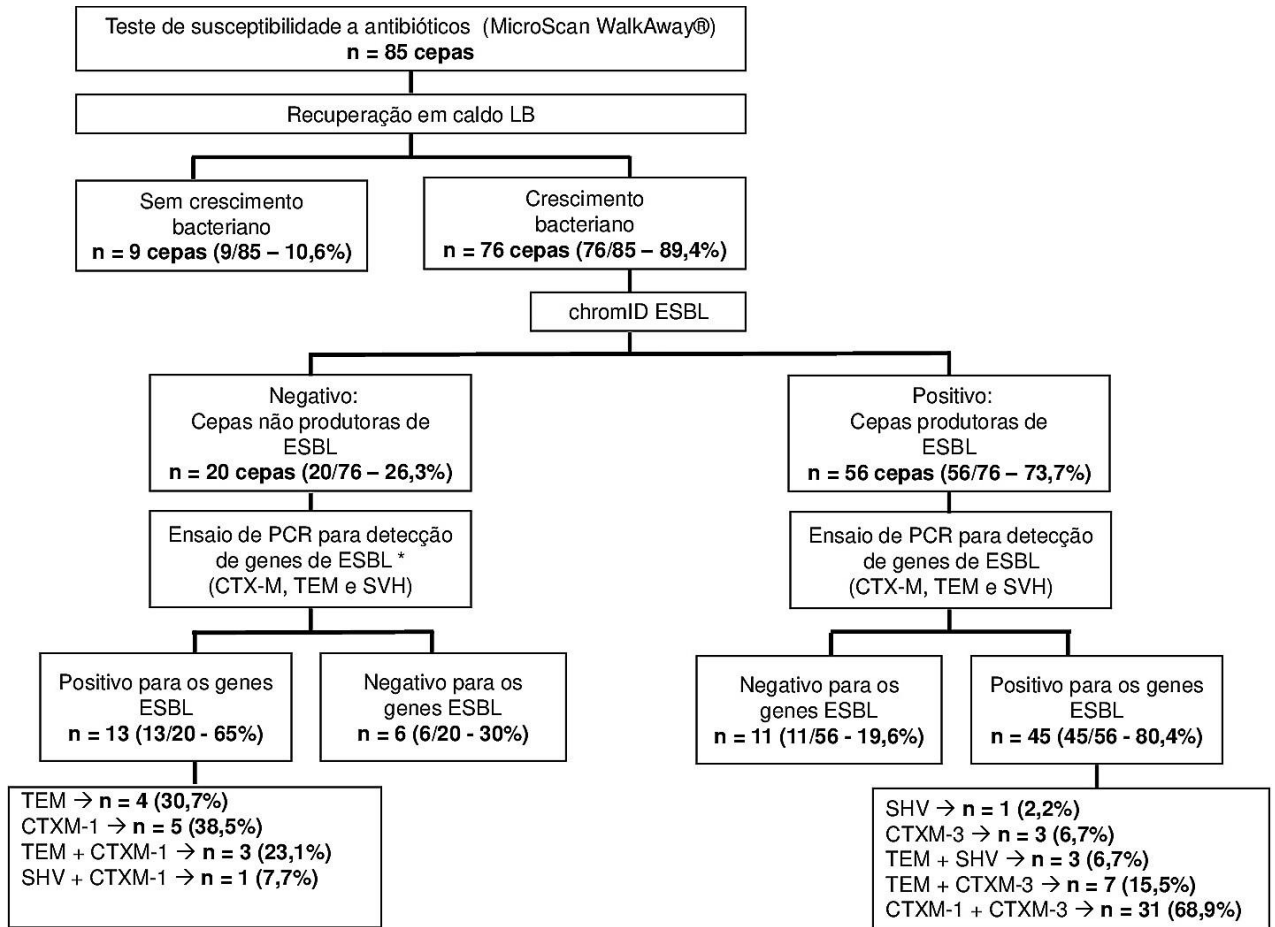


Figura 3. Demonstração das cepas semeadas em meio cromogênico para detecção de ESBL. O crescimento de colônias de tom vermelho/magenta indica crescimento de *E. coli* produtora de ESBL. Amostras 16, 17 e 18 foram semeadas, porém não apresentaram crescimento em meio cromogênico, ou seja, cepas não produtoras de ESBL.



*Uma cepa não apresentou crescimento bacteriano em LB.

Figura 4. Fluxograma de análises e resultados envolvendo as cepas de UPEC.

5.2. Perfil de genes ESBL

Existem várias classes de ESBL detectadas em enterobactérias, mas a maioria pertence às classes TEM, SHV e CTX-M. Tais enzimas são também frequentemente encontradas em *E. coli* (SHARMA *et al*, 2013). Por este motivo, os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-3} foram pesquisados nas amostras de UPEC.

Das cepas positivas para a produção de ESBL em meio cromogênico, 41 de 45 (91,1%) cepas apresentaram combinações de 2 genes de ESBL. Dentre estas, 31 cepas (68,9%) apresentaram o seguinte genótipo *bla*_{CTX-M-1}⁺ / *bla*_{CTX-M-3}⁺; sete cepas (15,5%) apresentaram a combinação de *bla*_{TEM}⁺ / *bla*_{CTX-M-3}⁺; e três cepas (6,7%) tinham os genes *bla*_{TEM}⁺ / *bla*_{SHV}⁺. Em contrapartida, a menor parte das cepas (n = 4) apresentou um único gene sondado de ESBL: três cepas (6,7%) apresentaram o gene

*bla*_{CTXM-3}⁺ e apenas uma cepa (2,2%) continha o gene *bla*_{SHV}⁺.

Das cepas que apresentaram fenótipo negativo para produção de ESBL em meio cromogênico (n = 20), cinco (38,5%) apresentaram *bla*_{CTXM-1}⁺ e quatro (30,7%) *bla*_{TEM}⁺. Combinações de genes ESBL também ocorreram. Três cepas (23,1%) apresentaram a combinação *bla*_{TEM}⁺ / *bla*_{CTXM-1}⁺ e uma cepa (7,7%) apresentou *bla*_{SHV}⁺ / *bla*_{CTXM-1}⁺.

Observa-se que a maioria (n = 50) das cepas apresentou genes da família CTX-M. Nossos achados são semelhantes aos citados na literatura que mostram a enzima CTX-M como a ESBL mais prevalente em todo o mundo (LINCOPAN, 2012). Em um estudo realizado por Bonnet (2004), observou-se que CTX-M é predominante em países asiáticos, europeus e países da América do Sul, incluindo o Brasil (BONNET, 2004). Na Europa, TEM e SHV eram as ESBL mais frequentemente isoladas. No fim dos anos 1990, o padrão mudou rapidamente devido ao aparecimento de CTX-M, que passou a ser predominante (LIVERMORE, *et al.*, 2007). Em um estudo mais recente realizado no Brasil em 2012, foi observado que a ESBL predominante era CTX-M (SILVA, K. C.; LINCOPAN, 2012).

A combinação de genes ESBL é comumente relatado na literatura, incluindo na espécie *E. coli*. Nos trabalhos realizados por Sharma *et al.* (2013) e Oliveira *et al.* (2009) foram encontradas cepas de *E. coli* com combinações de dois ou três genes de ESBL.

Entre as cepas positivas para a produção de ESBL em meio cromogênico, em onze cepas (19,6%) não foram encontrados nenhum dos genes pesquisados. Tais cepas podem estar portando outros genes de ESBL, como os genes da família PER ou genes da família VEB, dentre outros (LINCOPAN, 2012; BUSH; JACOBY, 2010).

5.3. Perfil de resistência de cepas produtoras de ESBL

As cepas de UPEC positivas em meio cromogênico para produção de ESBL foram submetidas a teste para detectar o perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos comumente prescritos para o tratamento de ITU. Em geral as cepas de UPEC apresentaram alta frequência de resistência a gentamicina (40%), tetraciclina (96,1%), sulfonamida (96,1%) e a todas fluoroquinolonas testadas [ácido nalidíxico (92,2%), ciprofloxacina (84,3%), levofloxacina (84,8%) e norfloxacina

(84,3%)]. Além do mais, a combinação de genes associados a ESBLs não alterou o perfil de susceptibilidade (tabela 3).

Observa-se que, além da resistência aos β -lactâmicos, as cepas ESBL são também resistentes a outras classes de antibióticos. Estudos tem mostrado que plasmídios que carregam genes ESBL frequentemente portam genes que conferem resistência a outras classes de antibióticos (GÜNDOĞDU, *et al*, 2012).

Tabela 3. Frequência de resistência das cepas produtoras de ESBL.

<i>Antibiótico</i>	<i>ESBL Resistente (n=51)</i>	<i>CTXM-1/ CTXM-3 (n=28)</i>	<i>TEM/ CTXM-3 (n=6)</i>
AMINOGLICOSÍDEO			
<i>Amicacina</i>	19,6%	25%	33,3%
<i>Gentamicina</i>	40%	35,7%	40%
CARBAPENEM			
<i>Meropenem</i>	2,2%	0%	0%
CEFALOSPORINA			
<i>Cefazolina</i>	92,2%	96,4%	83,3%
<i>Ceftriaxona</i>	84,3%	89,3%	100%
<i>Cefepime</i>	70,6%	71,4%	66,7%
PENICILINA			
<i>Amoxicilina/Ac.</i>	29,4%	28,6%	33,3%
<i>Ampicilina</i>	100%	100%	100%
FLUOROQUINOLONA			
<i>Ácido nalidíxico</i>	92,2%	100%	100%
<i>Ciprofloxacina</i>	84,3%	100%	100%
<i>Levofloxacina</i>	84,8%	96,1%	100%
<i>Norfloxacina</i>	84,3%	100%	100%
SULFONAMIDA			
<i>Sulfazotrim</i>	96,1%	94,6%	100%
TETRACICLINA			
<i>Tetraciclina</i>	96,1%	100%	100%
NITROFURANO			
<i>Nitrofurantoína</i>	13,7%	14,3%	33,3%

As cepas de ESBL foram susceptíveis ao meropenem, com exceção de um único caso. Também apresentaram menor frequência de resistência a amicacina e nitrofurantoína (com exceção das cepas com o genótipo TEM/CTX-M-3). Em estudos realizados por Stapleton *et al.* (2017) e outro estudo feito por Gupta *et al.* (2007) foi mostrado que a nitrofurantoína pode ser uma opção de tratamento em casos de ITU não complicadas.

Uma cepa de UPEC apresentou resistência ao meropenem. Produziu um halo de 13 milímetros (mm) sendo os pontos de corte: halo \leq 19 mm é considerado resistente e halo \geq 23 mm é considerado sensível. A mesma não apresentou nenhum dos genótipos pesquisados. Inicialmente, suspeitou-se que a cepa fosse uma β -lactamase do tipo carbapenemase, mas foi descartado, pois a mesma mostrou-se sensível as cefalosporinas (BUSH; JACOBY, 2010). A hipótese é que a cepa tenha uma diminuição da permeabilidade da membrana externa, devido à perda de porinas (ADLER, *et al.*, 2013; MARTÍNEZ; LÓPEZ, 2014).

Cepas de UPEC produtoras de ESBL produzem infecções multirresistentes e de difícil manejo com considerável impacto clínico. Recomenda-se que amostras confirmadas para a produção de ESBL em meio cromogênico sejam reportadas como resistentes a todas as cefalosporinas, com exceção dos carbapenens, até que se prove o contrário, independentemente dos resultados do teste de susceptibilidade. (BRADFORD, 2001).

6. CONCLUSÃO

- O meio cromogênico para detecção de ESBL apresentou falhas na detecção de cepas ESBL, gerando resultados falso-negativos.
- Os genes de ESBL mais frequentemente detectados nas cepas de UPEC foram os genes da família CTX-M.
- A caracterização genética mostrou que combinações de genes ESBL é predominante, ocorrendo com maior frequência a combinação $bla_{CTX-M-1}^+$ / $bla_{CTX-M-3}^+$.
- As cepas de UPEC produtoras de ESBL apresentaram alta frequência de resistência a gentamicina, tetraciclinas, sulfonamida e fluoroquinolonas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, C. M. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 397-406, 2008.

ADLER, M. *et al.* Influence of acquired β -lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 51-59, 2013.

AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

BADER, M. S.; HAWBOLDT, J.; BROOKS, A. Management of complicated urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. **Postgraduate Medicine**, v. 122, n. 6, p. 7-15, 2010.

BHAT, R. G.; KATY, T. A.; PLACE, T. A. Pediatric urinary tract infections. **Emergency Medicine Clinics of North America**. v. 29, n. 3, p. 637-653, 2011.

BIEN, J., SOKOLOVA, O., BOZKO, P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. **International journal of nephrology**, v. 2012, 2012.

BIONDI, S. *et al.* Current trends in β -lactam based β -lactamases inhibitors. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 27, p. 4223-4236, 2011.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

CHO, H.; UEHARA, T.; BERNHARDT, T. G. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1300-1311, 2014.

DA SILVA N. K. et al. Cefepime versus extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 167-169, 2011.

DHILLON, R. H.P.; CLARK, J. ESBLs: a clear and present danger?. **Critical care research and practice**, v. 2012, 2011.

ESSACK, S. Y. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 10, p. 1391–9, 2001.

FIROOZEH, F. *et al.* Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p. 219-222, 2014.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

FOXMAN, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infectious disease clinics of North America**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2014.

FOXMAN, B.; BROWN, P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. **Infectious disease clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 227-241, 2003.

FRÈRE, J. M.; PAGE, M. G.P. Penicillin-binding proteins: evergreen drug targets. **Current opinion in pharmacology**, v. 18, p. 112-119, 2014.

GEERLINGS, S. E. Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 5, 2016.

GÜNDOĞDU, A. *et al.* Prevalence and pathogenesis of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* causing urinary tract infection in hospitalized patients. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 11, p. 3107-3116, 2012.

GUPTA, K. *et al.* Short-course nitrofurantoin for the treatment of acute uncomplicated cystitis in women. **Archives of internal medicine**, v. 167, n. 20, p. 2207-2212, 2007.

GUPTA, V. An update on newer [beta]-lactamases. **Indian Journal of Medical Research**, v. 126, n. 5, p. 417, 2007.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Revised Ambler classification of β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 1050-1051, 2005.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário-ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 109-16, 2003.

Hooton T. M.; Stamm W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America** 1997;11:551-81.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KUMAR S. *et al.* Urinary Tract Infections. **Disiase-a-Month**, v 61, n 2, p. 45-59, 2015.

HLKOVÁ, P. *et al.* Phenotypes of *Escherichia coli* isolated from urine: Differences between extended-spectrum β -lactamase producers and sensitive strains. **Journal Of Microbiology, Immunology And Infection**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.329-334, jun. 2015.

LIVERMORE, D. M. *et al.* CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 165-174, 2007.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413-420, 2006.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 32, p. 4-9, 2014.

NICOLLE, L. E. Urinary tract infections in the elderly. **Clinics in geriatric medicine**, v. 25, n. 3, p. 423-436, 2009.

O'BRIEN, Valerie P. *et al.* Drug and vaccine development for the treatment and prevention of urinary tract infections. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 1, 2016.

OLIVEIRA, CF de *et al.* Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 556-60, 2009.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PITOUT, J. DD. *et al.* Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 52-59, 2005.

PITOUT, J. DD. Multiresistant *Enterobacteriaceae*: New threat of an old problem. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 6, n. 5, p. 657-669, 2008.

POURNARAS, S. *et al.* Detection of a novel variant bla CTX-M-3 extended spectrum β -lactamase gene in a community-acquired *Escherichia coli* isolate. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 38, n. 3, p. 213-216, 2006.

ROSEN, J. M.; KLUMPP, D. J. Mechanisms of pain from urinary tract infection. **International Journal of Urology**, v. 21, n. S1, p. 26-32, 2014.

SHARMA, M. *et al.* Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* **Journal of Clinical Diagnostic Research**, v. 7, n. 10, p. 2173-7, 2013.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

STAPLETON, A. E. Urinary tract infection pathogenesis: host factors. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 28, n. 1, p. 149-159, 2014.

STAPLETON, P. J. et al. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* urinary isolates and comparison with antibiotic consumption data over 10 years, 2005–2014. **Irish Journal of Medical Science** (1971-), p. 1-9, 2017.

SUBASHCHANDRABOSE, S., MOBLEY, H. L. T. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 4, 2015.

TULLUS, K. Vesicoureteric reflux in children. **Lancet**. 2014.

VALIQUETTE, L. Urinary tract infections in women. **Canadian Journal of Urology**. v. 8, n.1, p. 6-12, 2001.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 149-167, 2008.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 12: 3-7, 1999.

WORTHINGTON, R.J.; MELANDER, C. Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. **The Journal of organic chemistry**, v. 78, n. 9, p. 4207-4213, 2013.

ZHANG, Hongna et al. High prevalence and risk factors of fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from healthy rural residents of Taian, China. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 239, 2015.