

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

DENIS LEANDRO DE FREITAS

ANÁLISE MOLECULAR DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS E  
FLUORQUINOLONAS EM *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA

PONTA GROSSA  
2013

DENIS LEANDRO DE FREITAS

ANÁLISE MOLECULAR DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS E  
FLUORQUINOLONAS EM *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração em Biologia Evolutiva.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira  
Co-orientador: Profa. Dra. Carolina W. Galvão

PONTA GROSSA  
2013

Catálogo na Fonte  
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

- F866 Freitas, Denis Leandro de  
Análise molecular de resistência a quinolonas e fluorquinolonas em *Escherichia coli* uropatogênica / Denis Leandro de Freitas. Ponta Grossa, 2013.  
75f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.  
Orientador: Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira  
Orientadora: Profa. Dra. Carolina W. Galvão
1. Resistência. 2. Quinolonas. 3. Mutação. 4. *aac(6')-ib-cr*.  
5. modificações na membrana plasmática I. Silveira, Rafael Bertoni da. II. Galvão, Carolina W. III Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro – Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 615.329



## Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 14/2013

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **DENIS LEANDRO DE FREITAS**.

Aos vinte e sete dias do mês de março de dois mil e treze, no Hall Tecnológico, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Rafael Bertoni da Silveira em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **DENIS LEANDRO DE FREITAS**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Rafael Bertoni da Silveira (Orientador UEPG), Dr<sup>a</sup> Fabiane Gomes de Moraes Rego (UFPR) e Dr<sup>a</sup> Henriette Rosa de Oliveira Emilio (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Análise Molecular de Resistência a Quinolonas e Fluorquinolonas em *Echerichia coli* Uropatogênica**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 27 de março de dois mil e treze.

Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira

*Rafael Bertoni da Silveira*

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiane Gomes de Moraes Rego

*Fabiane Rego*

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Henriette Rosa de Oliveira Emilio

*Henriette Rosa de Oliveira Emilio*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Moysés e Clair, pelo incentivo e apoio para que eu continuasse estudando mesmo depois de tanto tempo longe das salas de aula.

A minha querida esposa Andreza, que está sempre ao meu lado me apoiando e me motivando a seguir em frente.

A minha filha Sabrina que tenho tanto orgulho. Sua existência por si só é o meu maior incentivo a buscar meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira, por todos os ensinamentos que me tem proporcionado.

Ao minha colega de laboratório Franciane por seu companheirismo e dedicação para a conclusão desse trabalho.

À Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão e ao Prof. Dr. Rafael Mazer Etto pelo suporte técnico. Obrigada também pela acolhida em seu laboratório!

À querida Jana por seu apoio e alegria e por compartilhar de sua experiência laboratorial que foi de grande ajuda na realização do trabalho.

Aos alunos de IC, Larissa, Luiz e Mônica por toda a ajuda que foi indispensável durante os dois anos de pesquisa.

À Profa. Dra. Helena B. Nader e ao Me. Marcelo A. de Lima juntamente a UNIFESP e a Profa. Dra. Maria Berenice R. Steffens, juntamente com a UFPR pela realização do sequenciamento das amostras.

À CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

À UEPG pelo suporte.

## RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU) apresentam grande ocorrência na população, afetando principalmente mulheres, idosos e gestantes. Na maioria dos casos uma ITU é causada por enterobactérias, especialmente *Escherichia coli*. A principal escolha no tratamento das ITUs são as quinolonas e fluorquinolonas. Desde sua descoberta na década de 60, tais antimicrobianos foram aperfeiçoados aumentando seu espectro de ação, porém os micro-organismos também evoluíram desenvolvendo resistência a tais fármacos. A resistência se resume a alterações nos alvos das quinolonas e ou a diminuição da concentração da droga no interior da célula. Quinolonas são antimicrobianos que têm como alvo duas enzimas envolvidas na replicação e transcrição do DNA bacteriano, a DNA Girase, formada por duas subunidades GyrA e duas GyrB, produtos dos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente e a Topoisomerase IV, também composta de duas subunidades ParC e duas ParE, codificadas a partir dos genes *parC* e *parE*. Mutações nesses genes podem conferir alto nível de resistência a estes antimicrobianos. Outros mecanismos envolvem genes transportados em plasmídeos, como os *qnr's*, responsáveis pela produção de proteínas capazes de proteger as enzimas alvo das quinolonas. O gene *aac(6')-ib-cr*, também presente em plasmídeos, é capaz de alterar a estrutura química de certas fluorquinolonas interferindo na sua eficiência. A associação de resistência a quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos devido à presença de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs), tem sido amplamente relatada na literatura. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar os padrões de resistência a quinolonas e fluorquinolonas em 55 amostras de *E. coli* uropatogênica coletadas em Curitiba, PR. A resistência ao ácido nalidíxico, a norfloxacin, ciprofloxacina e ofloxacina, foi observada em 69,1% das amostras. A análise molecular das cepas resistentes revelou mutações em *gyrA* (códon 83 e 87) e em *parC* (códon 80). Também foi pesquisada a presença dos genes *qnr's* e *aac(6')-ib-cr* e a associação destes com ESBLs. Duas das 55 amostras foram positivas para *aac(6')-ib-cr*. A presença desse gene no Brasil foi relatada pela primeira vez em 2012, em Belo Horizonte, MG. Nenhuma amostra foi positiva para os genes *qnr's*. Estes resultados mostram uma elevada incidência de resistência às quinolonas e a capacidade de transferência horizontal de resistência adquirida entre as cepas bacterianas.

Palavras-chave: Resistência, quinolonas, mutação, *aac(6')-ib-cr*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Moysés e Clair, pelo incentivo e apoio para que eu continuasse estudando mesmo depois de tanto tempo longe das salas de aula.

A minha querida esposa Andreza, que está sempre ao meu lado me apoiando e me motivando a seguir em frente.

A minha filha Sabrina que tenho tanto orgulho. Sua existência por si só é o meu maior incentivo a buscar meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira, por todos os ensinamentos que me tem proporcionado.

Ao minha colega de laboratório Franciane por seu companheirismo e dedicação para a conclusão desse trabalho.

À Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão e ao Prof. Dr. Rafael Mazer Etto pelo suporte técnico. Obrigada também pela acolhida em seu laboratório!

À querida Jana por seu apoio e alegria e por compartilhar de sua experiência laboratorial que foi de grande ajuda na realização do trabalho.

Aos alunos de IC, Larissa, Luiz e Mônica por toda a ajuda que foi indispensável durante os dois anos de pesquisa.

À Profa. Dra. Helena B. Nader e ao Me. Marcelo A. de Lima juntamente a UNIFESP e a Profa. Dra. Maria Berenice R. Steffens, juntamente com a UFPR pela realização do sequenciamento das amostras.

À CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

À UEPG pelo suporte.

## ABSTRACT

The urinary tract infections (UTI) have high incidence in the population, mainly affecting women, the elderly and pregnant women. In most cases an UTI is caused by Enterobacteriaceae, especially *Escherichia coli*. The main antimicrobials used in the treatment of UTIs, are the quinolones and fluoroquinolones. Since its discovery in the 60s, such antimicrobials were improved and increasing its spectrum of activity, but also the micro-organisms has evolved to develop resistance to these drugs. The resistance comes down to two mechanisms: changes in targets of quinolones or decreased concentration of the drug within the cell. Quinolones are antimicrobial agents that target two enzymes involved in transcription and replication of bacterial DNA, DNA Gyrase, consisting of two subunits GyrA and two GyrB products of the genes *gyrA* and *gyrB* respectively and Topoisomerase IV, also composed of two ParC and two ParE subunits, encoded from genes *parC* and *parE*. Mutations in these genes can confer high-level resistance to these antimicrobials. Other mechanisms involve genes carried in plasmids such as *qnr*'s, responsible for the production of proteins that protect the target enzymes of quinolones. The gene *aac (6')-Ib-cr* also present in plasmids can alter the chemical structure of certain fluoroquinolones interfering efficiency. The association of resistance to quinolones and  $\beta$ -lactams due to the presence of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) has been widely reported in the literature. The main objective of this study was to evaluate the patterns of resistance to quinolones and fluoroquinolones in 55 samples of uropathogenic *E. coli* collected in Curitiba, PR, Brazil. The resistance to nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin was observed in 69.1% of the samples. Molecular analysis of the resistant strains showed mutations in *gyrA* (codons 83 and 87) and *parC* (codon 80). Also investigated was the presence of genes *qnr*'s and *aac (6')-Ib-cr* and their association with ESBLs. Two of the 55 samples were positive for *aac (6')-Ib-cr*. The presence of this gene in Brazil was first reported in 2012 in Belo Horizonte, MG. No samples were positive for the *qnr*'s genes. These results show a high incidence of resistance to quinolones and the ability to horizontally spread of acquired resistance between the bacterial strains.

Keywords: Resistance, quinolones, mutation, *aac (6')-Ib-cr*

## LISTA DAS FIGURAS

|           |                                                                                                                      |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1  | Modelo da patogênese de uma ITU.....                                                                                 | 20 |
| Figura 2  | Estrutura química do ácido nalidíxico.....                                                                           | 21 |
| Figura 3  | Estrutura química da ciprofloxacina.....                                                                             | 22 |
| Figura 4  | Modificações que resultaram na terceira geração das quinolonas..                                                     | 23 |
| Figura 5  | Uma analogia pode ser feita da dupla hélice do DNA torcida para a direita, com um cordão de telefone espiralado..... | 25 |
| Figura 6  | Introdução de superenovelamento em uma molécula circular de DNA pela ação da DNA Girase.....                         | 26 |
| Figura 7  | Exemplo da introdução de superenovelamento positivo, pela separação de duas fitas em uma estrutura helicoidal.....   | 26 |
| Figura 8  | Principais atividades da DNA Girase e da Topoisomerase IV.....                                                       | 27 |
| Figura 9  | Ação de uma topoisomerase do tipo I.....                                                                             | 29 |
| Figura 10 | Mecanismo proposto para a reação de uma topoisomerase do tipo II.....                                                | 30 |
| Figura 11 | Perfil das 55 amostras quanto ao sexo dos pacientes.....                                                             | 57 |
| Figura 12 | Perfil das amostras, em relação à idade dos pacientes, independente do gênero.....                                   | 57 |
| Figura 13 | Perfil das amostras separadas por idade e sexo dos pacientes.....                                                    | 58 |
| Figura 14 | Frequência dos biótipos encontrados através da série bioquímica.....                                                 | 58 |
| Figura 15 | Genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> amplificados em duas das amostras testadas.....                                      | 60 |
| Figura 16 | Teste comparando os dois protocolos de PCR multiplex com <i>template</i> direto da colônia bacteriana.....           | 60 |
| Figura 17 | Resultado positivo para amplificação do gene <i>aac (6')-Ib-cr</i> em uma das duas amostras onde foi encontrado..... | 61 |

|           |                                                                                                                                        |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18 | Prova confirmando a amplificação do gene <i>aac(6')-ib-cr</i> .....                                                                    | 61 |
| Figura 19 | Parte do alinhamento entre o gene completo <i>gyrA</i> de <i>E. coli</i> K12, com as regiões amplificadas das amostras analisadas..... | 62 |
| Figura 20 | Parte do alinhamento entre o gene completo <i>parC</i> de <i>E. coli</i> K12, com as regiões amplificadas das amostras analisadas..... | 63 |

## LISTA DAS TABELAS

|          |                                                                                                         |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Sequência dos pares de <i>primers</i> utilizados para o PCR Multiplex....                               | 43 |
| Tabela 2 | Perfil de resistência aos antimicrobianos testados, encontrado nas amostras analisadas.....             | 59 |
| Tabela 3 | Comparação entre o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados e as mutações observadas..... | 64 |

## LISTA DAS ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |                                                                                                     |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ala            | Alanina                                                                                             |
| Amc            | Amoxicilina + ácido clavulânico                                                                     |
| Arg            | Arginina                                                                                            |
| Asp            | Ácido aspártico                                                                                     |
| Asn            | Asparagina                                                                                          |
| Atm            | Aztreonam                                                                                           |
| BHI            | <i>“Brain Heart Infusion”</i> , Ágar infusão, cérebro e coração                                     |
| BD             | Becton Dickinson                                                                                    |
| Caz            | Ceftazidima                                                                                         |
| CIM            | Concentração inibitória mínima                                                                      |
| Cip            | Ciprofloxacina                                                                                      |
| CLSI           | Clinical and Laboratory Standards Institute                                                         |
| CLED           | <i>“Cystine lactose eletrolyte deficient”</i>                                                       |
| Ctx            | Cefotaxima                                                                                          |
| Cys            | Cisteína                                                                                            |
| dNTP's         | Desoxirribonucleotídeos trifosfatados                                                               |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                                                             |
| EDTA           | Ácido etileno diamino tetracético                                                                   |
| ESBL           | <i>“Extended-Spectrum <math>\beta</math>-lactamases”</i> , $\beta$ -lactamases de espectro ampliado |
| Gln            | Glutamina                                                                                           |
| Glu            | Ácido glutâmico                                                                                     |
| Gly            | Glicina                                                                                             |
| I              | Intermediário                                                                                       |
| IDT            | Integrated DNA Technologies                                                                         |
| Ile            | Isoleucina                                                                                          |
| ITU            | Infecção do trato urinário                                                                          |
| LANAC          | Laboratório de análises clínicas de Curitiba                                                        |
| Leu            | Leucina                                                                                             |
| Met            | Metionina                                                                                           |
| Nal            | Ácido nalidíxico                                                                                    |
| Nor            | Norfloxacina                                                                                        |
| PBPs           | <i>“Penicillin-binding proteins”</i> , proteínas ligadoras de penicilina                            |

|         |                                                                                 |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------|
| PIAs    | <i>“Pathogenicity islands”</i> , ilhas de patogenicidade                        |
| PCR     | <i>“Polymerase Chain Reaction”</i> , reação em cadeia da polimerase             |
| Pro     | Prolina                                                                         |
| PRP     | <i>“Pentapeptide repeat proteins”</i> , proteína pentapeptídica repetida        |
| R       | Resistente                                                                      |
| S       | Sensível                                                                        |
| SAP     | <i>“Shrimp Alkaline Phosphatase”</i> , fosfatase alcalina                       |
| Ser     | Serina                                                                          |
| TAE     | Tris-Acetato-EDTA                                                               |
| Thr     | Treonina                                                                        |
| TSA     | <i>“Tryptic soy agar”</i> , Ágar trípico de soja                                |
| Tyr     | Tirosina                                                                        |
| UFPR    | Universidade Federal do Paraná                                                  |
| UNIFESP | Universidade Federal de São Paulo                                               |
| UPEC    | <i>Escherichia coli</i> uropatogênica, do inglês <i>“uropathogenic E. coli”</i> |
| Val     | Valina                                                                          |

## SUMÁRIO

|           |                                                                                         |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                  | <b>13</b> |
| 1.1.      | AS INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO.....                                                     | 13        |
| 1.1.1.    | EPIDEMIOLOGIA DAS ITUs.....                                                             | 14        |
| 1.1.2.    | DIAGNÓSTICO, ETIOLOGIA E TERAPÊUTICA.....                                               | 16        |
| 1.2.      | <i>Escherichia coli</i> COMO UM DOS PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS DAS ITUs.....        | 18        |
| 1.3.      | A CLASSE DAS QUINOLONAS .....                                                           | 21        |
| 1.3.1.    | CARACTERÍSTICAS GERAIS E EVOLUÇÃO.....                                                  | 21        |
| 1.3.2.    | MECANISMO DE AÇÃO.....                                                                  | 24        |
| 1.4.      | MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS E DERIVADOS.....                                 | 27        |
| 1.4.1.    | MECANISMOS CROMOSSOMAIS.....                                                            | 28        |
| 1.4.1.1.  | ALTERAÇÕES NAS ENZIMAS ALVO.....                                                        | 28        |
| 1.4.1.2.  | DIMINUIÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR.....                                   | 31        |
| 1.4.1.3.  | SUPEREXPRESSÃO DE BOMBAS DE EFLUXO.....                                                 | 32        |
| 1.4.2.    | MECANISMOS PLASMIDIAIS.....                                                             | 32        |
| 1.4.2.1.  | DETERMINANTES QNRs ( <i>QUINOLONE RESISTANCE</i> ).....                                 | 32        |
| 1.4.2.2.  | DETERMINANTES AAC (6')-ib-cr.....                                                       | 34        |
| 1.4.2.3.  | BOMBAS DE EFLUXO OqxAB e QepA.....                                                      | 35        |
| 1.4.3.    | OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS ASSOCIADOS AOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS..... | 36        |
| <b>2.</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                   | <b>39</b> |
| 2.1.      | OBJETIVO GERAL.....                                                                     | 39        |

|        |                                                                                                                                                         |           |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                                              | 39        |
| 3.     | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                          | <b>40</b> |
| 3.1.   | MEIOS DE CULTURA E REAGENTES.....                                                                                                                       | 40        |
| 3.2.   | EQUIPAMENTOS.....                                                                                                                                       | 40        |
| 3.3.   | MATERIAL BIOLÓGICO.....                                                                                                                                 | 41        |
| 3.4.   | METODOLOGIA.....                                                                                                                                        | 41        |
| 3.4.1. | ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS E IDENTIFICAÇÃO.....                                                                                                         | 41        |
| 3.4.2. | TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....                                                                                                       | 41        |
| 3.4.3. | AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PELA REAÇÃO EM CADEIA DA<br>POLIMERASE (PCR).....                                                                                | 42        |
| 3.4.4. | ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....                                                                                                                     | 43        |
| 3.4.5. | PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS DA PCR.....                                                                                                         | 43        |
| 3.4.6. | SEQUENCIAMENTO.....                                                                                                                                     | 44        |
| 4.     | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                  | <b>45</b> |
| 4.1.   | CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE<br>RESISTÊNCIA A FLUOQUINOLONAS EM <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS<br>DE URINA DE PACIENTES COM ITU..... | 45        |
| 5.     | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                                                  | <b>67</b> |
| 6.     | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                 | <b>68</b> |

## **1. INTRODUÇÃO**

A resistência dos patógenos às drogas antimicrobianas é um problema médico sério, devido ao rápido surgimento e disseminação de cepas mutantes, que são insuscetíveis ao tratamento médico (MANIKANDAN et al., 2011). As causas deste problema são multifatoriais, mas as questões centrais são claras. A emergência da resistência antimicrobiana é altamente correlacionada com a pressão seletiva que resulta do uso inadequado dos antimicrobianos (GOLDMANN & HUSKINS, 1997).

As infecções do trato urinário (ITU) afetam anualmente 150 milhões de pessoas em todo o mundo (STAMM & NORRBY, 2001) e a terapia antimicrobiana continua sendo a base do tratamento para pacientes com ITU (GRIEBLING, 2007). O intenso uso de antimicrobianos de amplo espectro para o tratamento dessas infecções também contribuiu para o surgimento de cepas resistentes (GOLDMANN & HUSKINS, 1997; MANIKANDAN et al., 2011).

O estudo dos mecanismos de resistência existentes é de extrema importância e se faz necessário, a fim de se avaliar o quanto o processo de evolução destes, influencia no uso dos antimicrobianos. Este tipo de trabalho auxilia a comunidade médica na prescrição de antibióticos em uma região específica, bem como a indústria farmacêutica, para melhorar as novas drogas que venham a ser lançadas. Além disso, é possível avaliar a capacidade de disseminação da resistência mediada por plasmídeos entre as linhagens bacterianas, podendo assim, contribuir para o surgimento de cepas multirresistentes, que são responsáveis por surtos, principalmente no ambiente hospitalar. Nesse contexto, esta pesquisa teve como objeto de estudo amostras bacterianas isoladas de urina de pacientes com suspeita de infecção urinária, com intuito de verificar a presença de cepas resistentes e analisar os mecanismos de resistência.

### **1.1. AS INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO**

Uma Infecção do trato urinário (ITU) refere-se à presença de patógenos microbianos nos órgãos que compõem este sistema, que normalmente é estéril. Geralmente a classificação das ITU é feita pelo local da infecção como uretrite (uretra), cistite (bexiga) ou pielonefrite (rim). Quando ocorre na uretra ou na bexiga é

considerada ITU inferior e pode, dependendo de fatores de virulência do patógeno ou condições predisponentes do hospedeiro, ascender para os ureteres e chegar aos rins, causando uma pielonefrite (ITU superior). A bexiga é o principal local de infecção em aproximadamente 95% de todas as ITUs. Uma ITU pode ser assintomática ou sintomática, caracterizada por um largo espectro de sintomas e sinais variando de micção irritativa leve, bacteremia, septicemia ou até complicações mais graves (FOXMAN & FRERICHES, 1985; MULVEY, 2002; ZORC et al., 2005).

Uma ITU pode ser complicada, ocasionada por um amplo espectro de patógenos, ou não complicada, causada por um grupo mais específico de micro-organismos. As ITUs complicadas ocorrem devido à falha na terapêutica pela presença de patógenos resistentes ou a alterações anatômicas e funcionais do trato urinário (STAMM & HOOTON, 1993). Uma ITU não complicada se refere a uma infecção na bexiga que não esteja associada à presença de corpos estranhos ou anormalidades anatômicas (GRIEBLING, 2007).

As ITUs apresentam grande ocorrência na população, situando-se entre as infecções bacterianas mais frequentes que afetam o ser humano, principalmente mulheres, idosos, gestantes, hospitalizados e diabéticos (STAMM & HOOTON, 1993; WARREN et al., 1999). Alguns estudos, como o de Tavares e colaboradores, mostram que a terceira maior causa de prescrição de antimicrobianos no sul do Brasil ocorre devido a infecções do trato urinário, perdendo apenas para infecções das vias aéreas superiores e amigdalites (TAVARES et al., 2008).

#### 1.1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS ITUs

Durante a infância, a epidemiologia varia conforme a idade, sexo e outros fatores. A maior incidência é observada em ambos os sexos no primeiro ano de idade e decresce nos meninos com o avanço da idade (ZORC, 2005).

Estima-se que aproximadamente 35% das mulheres saudáveis terão ao menos um episódio de ITU durante sua vida (LEE, 2007). Nas mulheres, a maior suscetibilidade à infecção é devida às condições anatômicas: uretra mais curta e a maior proximidade da vagina com o ânus. A atividade sexual e o uso de certos contraceptivos, como espermicidas, também parecem contribuir para ITU (GRIEBLING, 2007). Após a menopausa, com a ausência de estrógeno, ocorre uma mudança significativa na microbiota endógena da vagina, o que pode contribuir para

a colonização por patógenos que podem ascender pela uretra, causando ITU. O estrógeno é essencial para manter a acidez da vagina e permitir a manutenção de lactobacilos, importantes na defesa natural do corpo (GRIEBLING, 2007). A colonização da vagina por uropatógenos não necessariamente leva a ITU. Isso pode variar significativamente de mulher para mulher e pode estar relacionada com um evento paralelo como a atividade sexual (HOOTON, 2000).

Mulheres com diabetes mellitus têm maior incidência de ITU do que as que não são diabéticas. Pacientes diabéticos têm mais chances de apresentar bacteriúria (presença de bactérias na urina) assintomática, a qual pode levar a um quadro de ITU que facilmente pode evoluir para complicações renais (RONALD & LUDWIG, 2001; STAPLETON, 2002). A patogênese da ITU associada à diabetes mellitus pode estar relacionada a vários fatores. É de se esperar que a bactéria cresça mais facilmente em uma urina com maior concentração de glicose e em mulheres diabéticas há uma alta incidência de bacteriúria assintomática. Porém, a relação direta entre o aumento da glicose na urina e bacteriúria assintomática é pouco elucidado. O que se sabe é que níveis altos de glicose prejudicam a ação dos neutrófilos, portanto, comprometendo a ação do sistema imune. Alterações na micção devido à neuropatia, causada pela diabetes mellitus de longa duração, também podem contribuir para infecção, devido nestes casos, à retenção de urina residual. Ainda, uma proteína chamada *Tamm-Horsfall* tem a capacidade de se ligar as fímbrias do tipo I em *Escherichia coli*, prevenindo a adesão e colonização do uroepitélio pela bactéria. Certas pessoas com diabetes mellitus tem deficiência dessa proteína, aumentando então a predisposição à infecção nessas pessoas (RONALD & LUDWIG, 2001; CHEN et al., 2009).

Durante a gravidez o trato urinário passa por várias modificações que contribuem para ITU. Depois do primeiro mês de gravidez, os ureteres e a pelve renal sofrem dilatação que pode aumentar em até 200 mL o volume de urina e a bexiga sofre um deslocamento à medida que a gestação avança. Alterações hormonais que ocorrem nos meses gestacionais parecem ser mais significativas para bacteriúria durante a gestação. Além disso, as variações no sistema imunológico durante a gravidez são amplas, fato esse que facilita o aparecimento das infecções urinárias (PATTERSON & ANDREOLI, 1997). Bacteriúria assintomática é encontrada em 4-7% das mulheres grávidas e está associada com parto prematuro e baixo peso ao nascer. A pielonefrite desenvolve em 30-40% das

mulheres grávidas com bacteriúria não tratada, em comparação com 1-2% das gestações sem bacteriúria (LEE, 2007).

Diferente das mulheres que têm uma distribuição mais uniforme de casos de ITU entre as idades, nos homens a incidência é baixa entre os jovens e aumenta drasticamente com o avanço da idade (GRIEBLING, 2007).

Um estudo de Dias Neto e colaboradores (2003) mostra uma maior incidência de ITU em homens com mais de 50 anos de idade, podendo estar relacionado com outras patologias como doenças da próstata, provavelmente relacionado à atividade bactericida do fluido prostático (ARIATHIANTO, 2011).

Os indivíduos hospitalizados são um grupo bastante vulnerável às ITUs, devido a sua condição debilitada. As ITUs associadas ao uso de cateteres são as infecções nosocomiais de maior ocorrência e muitas vezes são repetitivas além de poderem ter múltiplos agentes etiológicos (FOXMAN, 2002).

Já os idosos de ambos os sexos podem ser acometidos por essas infecções devido a uma série de fatores como: higiene precária, alterações anatômicas do próprio trato urinário, presença de cálculos renais, diabetes, Alzheimer, doença de Parkinson, entre outros. Ainda nesse grupo há maior risco de recorrências e, consequentemente, falhas terapêuticas (ARIATHIANTO, 2011).

### 1.1.2. DIAGNÓSTICO, ETIOLOGIA E TERAPÊUTICA

O diagnóstico clínico é feito avaliando-se os sinais e sintomas como: disúria, piúria, polaciúria, hematúria em alguns casos e dor suprapúbica, característicos de cistite. Já uma infecção na porção superior do trato urinário (pielonefrite) inicia-se como um quadro de cistite acompanhado de febre, calafrio e dor lombar que pode se irradiar para o abdômen. A presença de bactérias na urina em um número significativo pode ser diagnosticada como ITU (LOPES & TAVARES, 2005).

Bactérias entéricas podem ascender até as primeiras porções da uretra, portanto certos cuidados devem ser tomados durante a coleta. No laboratório, um caso de ITU pode ser confirmado por urocultura de uma amostra de urina de jato médio, coletado pela manhã de maneira asséptica que apresente um crescimento de  $10^5$  UFC/mL de amostra. Porém em certos casos como, por exemplo, em idosos, infecções crônicas ou uso de antibióticos, valores de até 100 UFC/mL de urina são confirmatórios. Em amostras coletadas direto da bexiga, qualquer crescimento

bacteriano é comprovatório de ITU (ORENSTEIN & WONG, 1999; FIHN, 2003; LOPES & TAVARES, 2005). A presença de leucócitos na urina (piúria) é um indicador de inflamação pela infecção bacteriana do trato urinário (GRIEBLING, 2007), portanto, através de um exame de urina I com sedimentos urinários, onde podem ser observados leucócitos, hemácias e bactérias, o diagnóstico de ITU pode ser confirmado (LOPES & TAVARES, 2005).

A etiologia das ITUs difere entre as infecções complicadas e não complicadas. Nas infecções complicadas há uma maior diversidade de patógenos, pois certos fatores anatômicos, metabólicos ou imunológicos associados a esse tipo de infecção, tornam o paciente suscetível a micro-organismos que não causariam doença em pessoas saudáveis (RONALD, 2003).

Em ITUs comunitárias, *Escherichia coli* é o agente etiológico em cerca de 80% dos casos, seguida de *Staphilococcus saprophyticus*, espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Proteus* (RONALD, 2003). No ambiente hospitalar *E. coli* aparece em 50% dos casos, e além das espécies citadas anteriormente, são associados a ITU nasocomiais *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Serratia* e *Citrobacter* (GRIEBLING, 2007).

A terapia antimicrobiana continua a ser a base do tratamento para pacientes com ITUs. O antibiograma é utilizado para orientar a seleção da droga de escolha. No entanto, a maioria dos pacientes sintomáticos exigem o início do tratamento antes da identificação do organismo e sua suscetibilidade. Nestes casos a terapia inicial é habitualmente empírica, com as modificações subsequentes feitas com base na cultura de urina. Muitos especialistas defendem a terapia empírica para a maioria dos pacientes, com as culturas de urina reservados para aqueles que não respondem ao tratamento ou têm infecções recorrentes (GRIEBLING, 2007).

Como primeira linha de defesa é prescrito sulfametoxazol-trimetropim e em caso de falha no tratamento são recomendadas certas fluorquinolonas. Em regiões onde a resistência a sulfametoxazol-trimetropim ultrapassa 20% a primeira linha de defesa é feita com fluorquinolonas (GRIEBLING, 2007). Quinolonas e fluorquinolonas são antimicrobianos amplamente usados no tratamento das ITUs (STAMM & NORRBY, 2001; VAN BAMBEKE et al., 2005).

## 1.2. *Escherichia coli* COMO UM DOS PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS DAS ITUs

Os membros do gênero *Escherichia* são comuns no trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente. O conhecimento a respeito de *Escherichia coli* é superior ao de qualquer outra espécie de bactéria, devido a sua importância médica (MADIGAM et al., 2004). *E. coli* é o anaeróbico facultativo predominante na microbiota endógena humana e normalmente vive harmoniosamente confinado no lúmen intestinal. No entanto, em pessoas imunodeprimidas, ou quando a barreira intestinal é quebrada, pode se tornar patogênica (NATARO & KAPER, 1998). Segundo Winn Jr e colaboradores (2006), *E. coli* é a espécie bacteriana mais comumente isolada em laboratórios clínicos relacionada a processos infecciosos, acometendo praticamente todos os tecidos e sistemas orgânicos dos seres humanos. *E. coli* é a bactéria mais frequente em casos de infecção do trato urinário, quer na comunidade ou no ambiente hospitalar, sendo classificada assim como *E. coli* uropatogênica (UPEC).

Um trabalho de Dias Neto e colaboradores em (2003) relata a ocorrência de Gram-negativos em 80% das ITUs em paciente hospitalizados, onde *E. coli* é a mais frequente desse grupo, responsável por 26% dos casos seguida de *Klebsiella sp* (15%) e *Pseudomonas aeruginosa* (15%).

Uma vez dentro do trato urinário, a bactéria se depara com uma série de defesas do hospedeiro, que incluem o fluxo de urina e as células do sistema imunológico. Para superar e evadir essas defesas os uropatógenos tem evoluído com mecanismos de aderência e penetração no tecido do hospedeiro (MULVEY, 2002). Um passo crítico relacionado com a patogênese de *E. coli* no trato urinário é a presença de fímbrias ou pili dotadas de moléculas de adesinas, capazes de ligar a receptores das células hospedeiras e mediar a internalização da bactéria no tecido, permitindo sua multiplicação e evasão do sistema imunológico (SCHILLING et al., 2001; RONALD, 2003). Entre os principais fatores de virulência associados à UPEC, que permitem a colonização do trato urinário, incluem fímbrias do tipo 1, P, S, F1C, afimbrial adesina, toxinas (hemolisina, colicina, aerobactina, fator necrosante citotóxico) e revestimentos de polissacarídeos (ARISOY et al., 2006; SANTO et al., 2006; WILES, 2008).

Em UPEC, os genes responsáveis pelos fatores de virulência estão

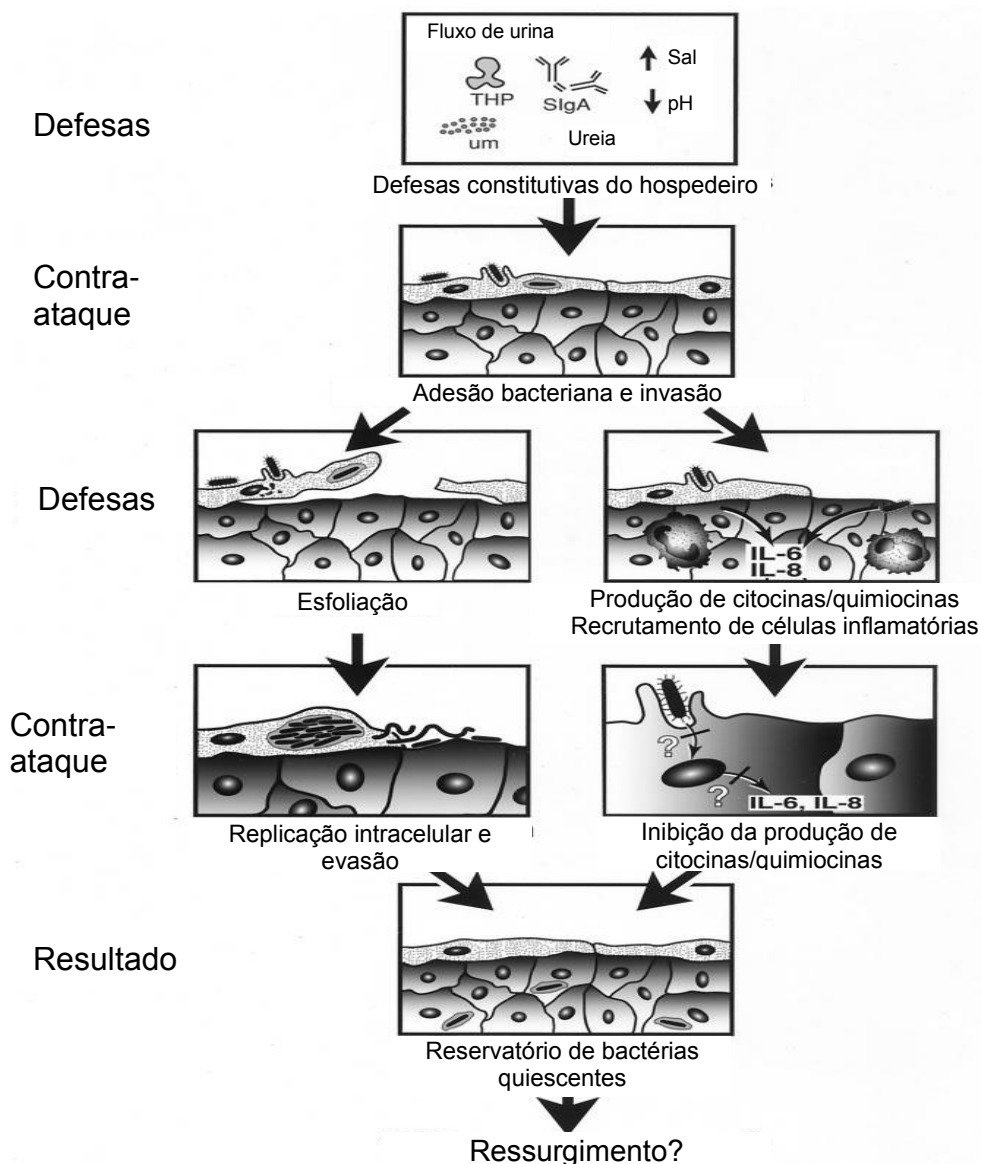
presentes em regiões do genoma bacteriano, chamadas de ilhas de patogenicidade (*pathogenicity islands* - PAIs). Comparado com *E. coli* comensal e a cepa K12, o genoma das UPECs comporta mais genes e é maior, pois precisa de adaptações para sobreviver fora de seu ambiente natural. A presença de antígenos como o polissacarídeo O (somático), situado na membrana externa dos Gram-negativos, o polissacarídeo K (capsular) e o antígeno H (flagelar) também são fatores envolvidos na virulência e utilizados na classificação dos diferentes sorotipos de *E. Coli* (WILES, 2008).

Na bexiga, uma infecção inicia-se pela adesão das fímbrias tipo 1 às células que revestem internamente este órgão, evitando assim que o fluxo de urina as remova do trato urinário. Na sequência, as próprias células epiteliais internalizam a bactéria dentro do seu citoplasma, por um rearranjo do citoesqueleto devido à ligação de uma adesina (FimH), localizada na frímbria tipo 1. A bactéria se beneficia disso, pois o ambiente externo ao epitélio é desfavorável ao seu crescimento devido ao baixo pH e a alta concentração de sal da urina. Ainda, no ambiente externo do epitélio, a bactéria está mais acessível aos antibióticos e aos anticorpos. Após invadir a célula, a bactéria multiplica-se formando biofilmes intracelulares. Vários eventos da resposta imune são disparados, como a liberação de citocinas e a esfoliação. Durante a esfoliação, as células do epitélio invadidas morrem por apoptose, na tentativa de eliminar a bactéria junto com o fluxo de urina. Porém, antes que a célula morra, a bactéria evade a célula, assumindo uma morfologia filamentosa, o que parece contribuir para a invasão da célula epitelial vizinha, facilitando a permanência da UPEC na bexiga (SCHILLING et al., 2001).

Também envolvidos no processo de infecção estão as toxinas secretadas pela UPEC, como a  $\alpha$ -hemolisina, que promove a abertura de poros na célula hospedeira levando a lise. O fator necrosante citotóxico atua em uma família de proteínas chamadas Rho GTPases, influenciando em várias funções celulares por agirem sobre os filamentos de actina. Ainda, durante o processo de adesão celular, a bactéria secreta sideróforos, como a enterobactina. Os sideróforos sequestram ferro, importante tanto para o metabolismo da bactéria quanto para as células do hospedeiro (WILES, 2008). A figura 1 mostra um resumo do processo de infecção.

No isolamento e na identificação laboratorial a *E.coli* apresenta capacidade de fermentação da glicose, resultado negativo para teste de oxidase e pode reduzir nitrato a nitrito. Vários outros testes bioquímicos podem ser realizados mostrando

características metabólicas distintas deste micro-organismo frente a diversos substratos. Exemplos são: a produção de indol a partir do triptofano e a incapacidade de utilizar o citrato como única fonte de carbono (WINN Jr et al., 2006).

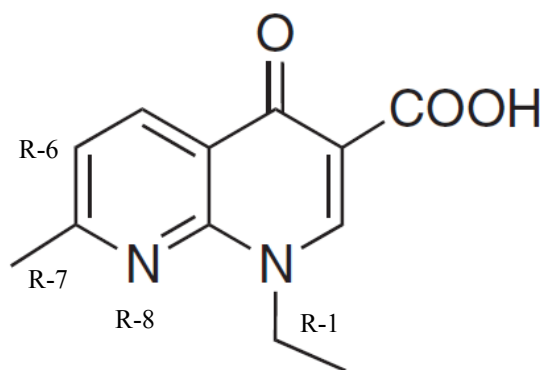


**Figura 1:** Modelo da patogênese de uma ITU. Quando a UPEC invade a bexiga, os organismos enfrentam um formidável conjunto de defesas constitutivas, muco (um), proteína Tamm-Horsfall (THP), imunoglobulina IgA secretora (SIgA), condições desfavoráveis de crescimento (pH, salinidade) e o fluxo de urina. Para ultrapassar estes mecanismos, a bactéria precisa se ligar e invadir as células epiteliais superficiais da bexiga, através da expressão da fímbria tipo 1. No entanto, estes eventos acionam as defesas induzíveis do hospedeiro, tais como apoptose superficial celular (esfoliação) produção de citocina e quimiocina. Estas defesas, respectivamente, conduzem ao desprendimento de células infectadas para a urina e o recrutamento de células do sistema imune. Cepas de UPEC são capazes de se replicar e sair das células hospedeiras, numa forma filamentosa, antes da conclusão do programa de morte. Desta forma, ela infecta a célula subjacente, facilitando sua permanência dentro de bexiga. Além disso, as cepas de UPEC são capazes de neutralizar a resposta de citocinas/quimiocinas. O resultado final destas interações dinâmicas durante a infecção aguda é a criação de um reservatório persistente de bactérias intracelulares dentro do epitélio da bexiga. IL-6 interleucina 6 e IL-8 interleucina 8. Fonte: adaptado de SCHILLING et al., 2001.

### 1.3. A CLASSE DAS QUINOLONAS

#### 1.3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E EVOLUÇÃO

Ao contrário de alguns dos primeiros antibióticos descobertos durante o século passado, a classe das quinolonas não foi isolada a partir de organismos vivos, mas, em vez disso, foi sintetizada quimicamente. Em 1962, Leshner e colaboradores fizeram a descoberta acidental do ácido nalidíxico (figura 2), como um subproduto da síntese do antimalárico cloroquina (ANDRIOLE, 2005). O uso do ácido nalidíxico foi originalmente limitado devido ao seu estreito espectro de atividade, baixa concentração sérica e aos problemas de toxicidade, mas recuperou atenção na década de 1980 para o tratamento da diarreia e de infecções do trato urinário após o desenvolvimento de resistência em *E. coli* e *Shigella* a outras classes de antibióticos utilizadas na época (VAN BAMBEKE et al., 2005). Com o passar dos anos, várias modificações nesse protótipo (nas posições R-1, R-6, R-7, e R-8) alteraram a atividade antimicrobiana, a farmacocinética e o espectro de ação contra grupos específicos de microrganismos (ANDRIOLE, 2005). Assim, as quinolonas disponíveis para uso clínico foram classificadas em quatro gerações, principalmente com base no seu espectro de atividade (VAN BAMBEKE et al., 2005).



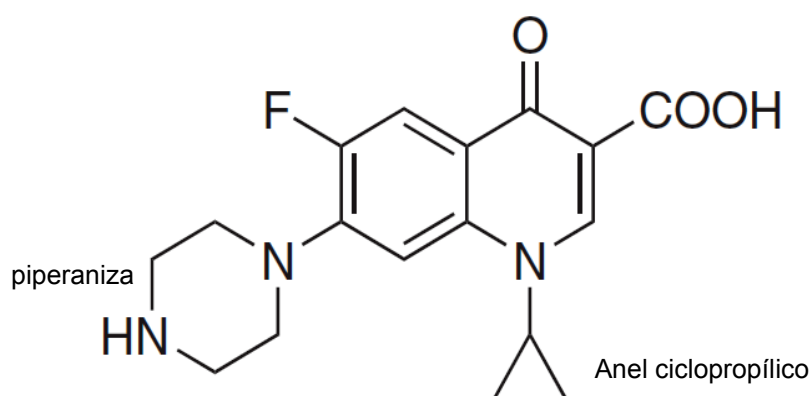
**Figura 2:** Estrutura química do ácido nalidíxico destacando os principais pontos das mudanças dos radicais que alteram a atividade antimicrobiana destes fármacos. Fonte: Adaptado de GUIMARÃES et al., 2010.

A evolução das quinolonas seguiu dois caminhos paralelos: as naftiridinas mantendo o núcleo original do ácido nalidíxico e as fluorquinolonas, que se diferenciam por possuírem um átomo de flúor na posição R-6 e a substituição do nitrogênio por um carbono na posição R-8. A adição de uma piperazina ao núcleo do ácido nalidíxico na posição R-7 conferiu a primeira geração destes fármacos uma

atividade anti-pseudomonas (BALL, 2000).

A segunda geração dividida em 2a e 2b é marcada pela atividade predominante contra Gram-negativos (geração 2a) e uma melhora contra certos Gram-positivos como *Streptococcus pneumoniae* (geração 2b). Porém, a geração 2b é menos eficiente contra *Pseudomonas* (BALL, 2000).

A ciprofloxacina (figura 3) é o antibiótico mais ativo da classe das fluoroquinolonas frente a bactérias Gram-negativas. Origina-se da introdução de um radical ciclopropílico na posição R-1, incrementando o amplo espectro de ação, enquanto a substituição do nitrogênio da posição R-8 por um carbono reduziu as reações adversas e aumentou a atividade frente a *Staphylococcus aureus* (GUIMARÃES et al., 2010). Entre as fluorquinolonas de segunda geração, a ciprofloxacina foi apontada como o agente antibacteriano mais consumido em todo o mundo. Este alto nível de uso, ou o uso desnecessário, tem sido acusado do rápido desenvolvimento de resistência bacteriana a esses agentes (RUIZ, 2003).

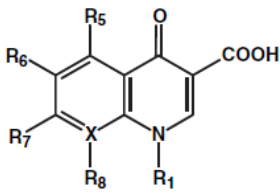
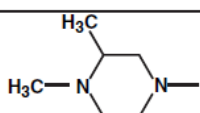
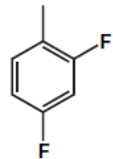
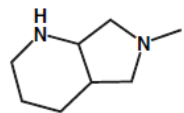
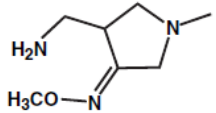


**Figura 3:** Estrutura química da ciprofloxacina mostrando o anel ciclopropílico adicionado na posição R-1 e o flúor na posição R-6. Notar que na posição R-8 diferente do ácido nalidíxico está um carbono e não um nitrogênio. Fonte: Adaptado de GUIMARÃES et al., 2010.

Uma nova melhoria na atividade contra bactérias Gram-positivas, em conjunto com uma atividade significativa contra anaeróbicos, foi observada na terceira geração, causada pela presença de um alquil no anel piperazina ou pirrolidina na posição 7 e de um grupo metoxi na posição 8 (figura 4) (VAN BAMBEKE et al., 2005). A quarta geração é marcada pela adição de um radical metox na posição R-8, que confere potente ação contra aneróbicos e atividade melhorada contra pneumococcus (ANDRIOLE, 2005).

A classificação das quinolonas varia entre os diversos autores consultados, dependendo dos critérios levados em consideração (estrutura química, toxicidade,

pela determinação *in vitro* do espectro de atividade antimicrobiana, ou eficácia clínica). Por exemplo, no trabalho de Andriole (2005), trovafloxacin, moxifloxacin e gemifloxacin, são considerados quinolonas de quarta geração. No entanto para Van Bambeke e colaboradores (2005), trovafloxacin e moxifloxacin pertencem a geração 3a e gemifloxacin a 3b. Este autor considera a quarta geração as des-fluorquinolonas representada pelo garenoxacin.

|  |               |   |                    |                                                                                     |                |                |                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Geração                                                                            | Droga         | X | R <sub>8</sub>     | R <sub>1</sub>                                                                      | R <sub>5</sub> | R <sub>6</sub> | R <sub>7</sub>                                                                        |
| 3a                                                                                 | Gatifloxacin  | C | -O-CH <sub>3</sub> |    | H              | F              |    |
|                                                                                    | Trovafloxacin | N |                    |  | H              | F              |  |
|                                                                                    | Moxifloxacin  | C | -O-CH <sub>3</sub> |  | H              | F              |  |
| 3b                                                                                 | Gemifloxacin  | N |                    |  | H              | F              |  |

**Figura 4:** Modificações que resultaram na terceira geração das quinolonas dividida em 3a e 3b. Na posição R-8, observa-se o radical metox (gatifloxacin e moxifloxacin). Na posição R-7 ocorre a adição do radical alquil a piperazina (gatifloxacin). Fonte: adaptado de VAN BAMBEKE et al., 2005.

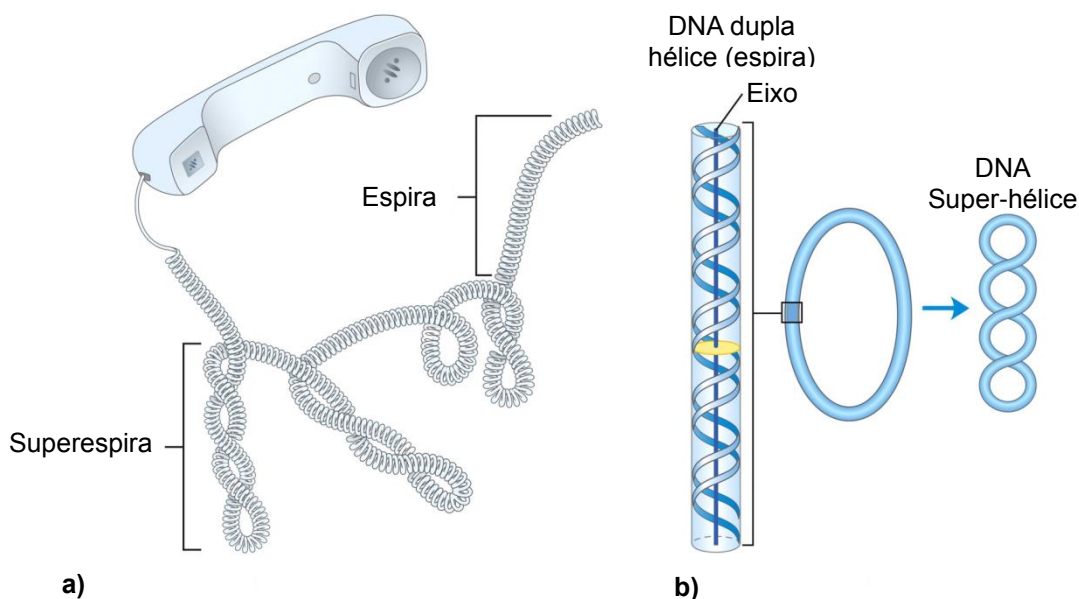
As modificações que ocorreram durante a evolução das quinolonas visaram melhorar a ação das drogas em vários aspectos. A adição do flúor, além das citadas anteriormente no texto, melhorou a atividade inibitória da enzima alvo do fármaco (discutido mais adiante) e facilitou a penetração na célula bacteriana. A adição de um segundo flúor na posição R-8 resulta em aumento da absorção e um longo tempo de meia-vida (tempo necessário para que a concentração plasmática de determinado fármaco seja reduzida pela metade), mas também aumenta a fototoxicidade. A adição do grupo piperazina, na posição R-7, além da maior atividade contra aeróbios

Gram-negativos, aumentou a atividade contra *Staphylococcus* e espécies de *Pseudomonas*. A alquilação do anel R-7 aumentou a atividade contra bactérias Gram-positivas e aumentou a meia vida destes compostos. Ainda, a adição de um grupo metil ao átomo de nitrogênio distal do anel de piperazina também aumentou o tempo de meia-vida e melhorou a biodisponibilidade. Além disso, o aumento da atividade contra espécies de *Mycoplasma* e *Chlamydia* foi conseguido pela adição de um grupo amino em R-5 e um flúor na posição R-8 para quinolonas, que possuíam um grupo ciclopropilo em R-1 (ANDRIOLE, 2005).

### 1.3.2. MECANISMO DE AÇÃO

O cromossomo bacteriano apresenta um tamanho aproximado de 1300  $\mu\text{m}$ , enquanto que a bactéria mede aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de comprimento por 1  $\mu\text{m}$  de largura. Assim, o DNA bacteriano é 500 vezes maior que a própria célula e para que todo esse material genético caiba dentro da bactéria, ele precisa estar em uma forma organizada chama DNA superenovelado (ANDRIOLE, 2005).

O superenovelamento pode ocorrer de duas formas, negativo ou positivo. A maioria do DNA encontrado na natureza se encontra superenovelado negativamente. O superenovelamento negativo resulta de uma torção contrária ao da dupla hélice, que se enrola para a direita. A tensão gerada desse processo se deposita ao longo do eixo da dupla hélice, que se enrola sobre si mesmo (figura 5). Para que isso aconteça, uma torção seguida de quebra e religação devem ocorrer em uma ou nas duas fitas do DNA dependendo do tipo de enzima envolvida no processo (COZZARELLI, 1980; KAMPRANIS, 1999; TRAVERS, 2005). Este estado topológico do DNA desempenha um papel importante na atividade biológica e é mantido por um grupo de enzimas chamadas topoisomerases. Tais enzimas são divididas em dois grupos: as do tipo 1 promovem quebra em uma das duas fitas do DNA e as do tipo 2 quebram as duas fitas da dupla hélice (KAMPRANIS, 1999).



**Figura 5:** (a) Uma analogia pode ser feita da dupla hélice do DNA torcida para a direita, com um cordão de telefone espiralado. Quando o cordão se enrola sobre ele mesmo no sentido contrário da espiral, gera uma superespira. (b) Quando uma torção é aplicada no sentido contrário da dupla hélice do DNA, este se dobra sobre si mesmo, formando uma superespira. Fonte: LEHNINGER, 2006.

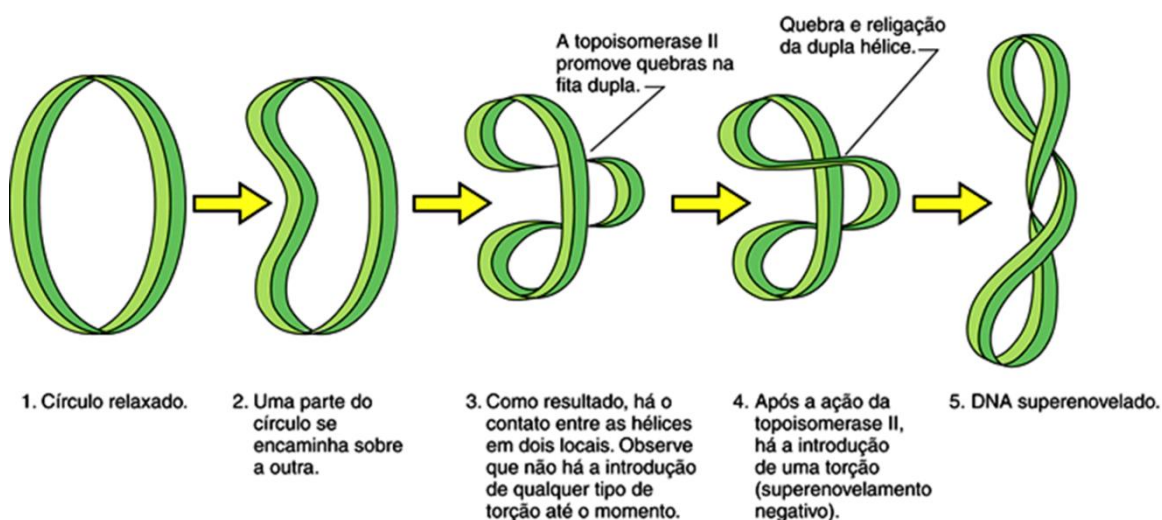
Quinolonas são antimicrobianos que têm como alvo duas topoisomerases do tipo 2, com papel crucial na replicação e transcrição do DNA bacteriano, a DNA Girase (Topoisomerase II), formada por duas subunidades GyrA e duas GyrB, produtos dos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente e a Topoisomerase IV, também composta de duas subunidades ParC e duas ParE, codificadas a partir dos genes *parC* e *parE*. A inibição dessas enzimas interfere na síntese de ácidos nucleicos resultando em morte da célula (DRALICA & ZHAO, 1997). A interação das quinolonas com os complexos DNA Girase-DNA ou Topoisomerase-DNA causa mudanças conformacionais nestes e nas próprias enzimas. Assim, o tratamento da bactéria com quinolonas rapidamente interrompe a síntese de DNA. Este efeito resulta provavelmente da capacidade de o complexo quinolona-enzima-DNA de bloquear a progressão da forquilha de replicação (HOOPER, 1999).

A DNA Girase é responsável pelo superenovelamento negativo da dupla fita de DNA, necessário para a replicação, recombinação e transcrição (figura 6). Ainda, este processo reduz o volume do cromossomo circular da bactéria, facilitando seu acomodamento dentro da célula (COZZARELLI, 1980).

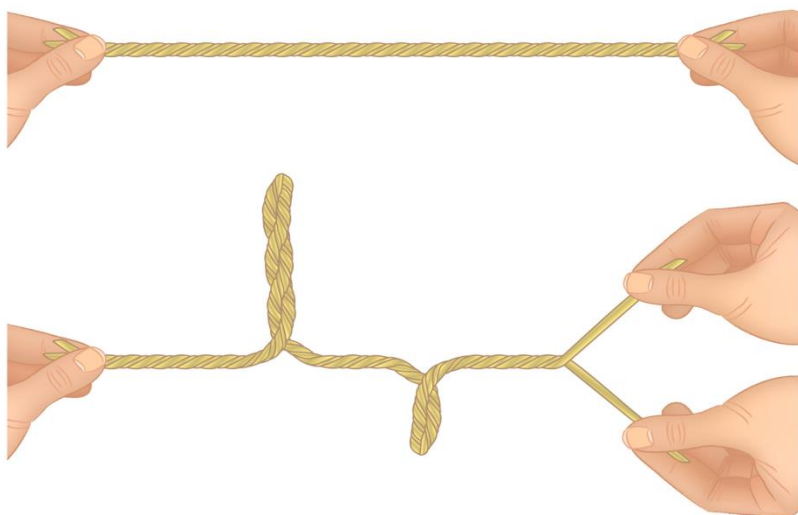
O principal papel da Topoisomerase IV é a decatenação (separação) das moléculas filhas de DNA, durante a replicação, e também auxiliar no avanço da forquilha de replicação, que introduz superenovelamento positivo durante esse processo (figura 7). Ambas as enzimas realizam suas funções por acoplamento a

hidrólise de ATP durante a quebra e religação da dupla fita de DNA ao relaxar ou introduzir superenovelamento (HARDY & COZZARELLI, 2002).

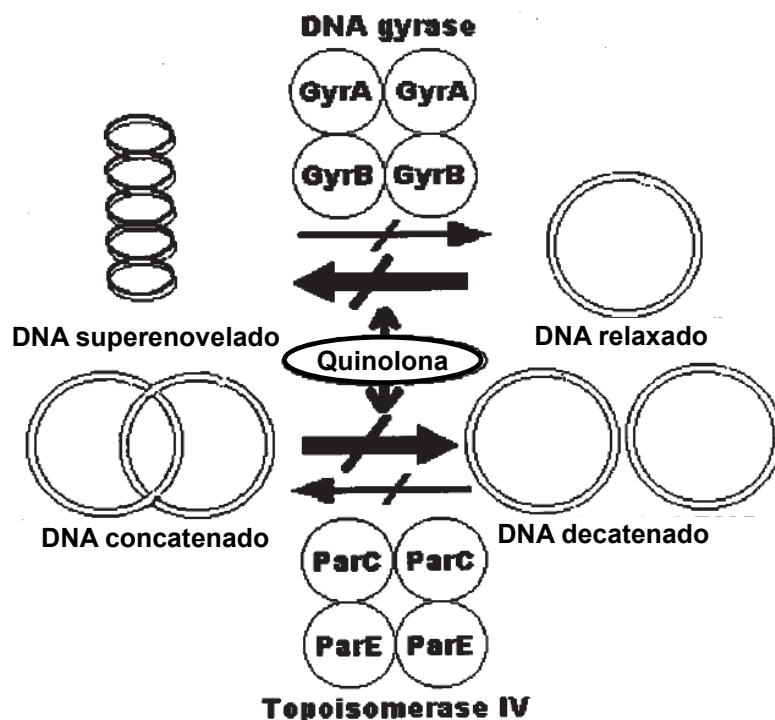
Estudos genéticos de *E. coli* e outras enterobactérias, assim como de certos Gram-positivos, como *S. aureus*, demonstram que parece haver um padrão onde a DNA Girase é o alvo primário das quinolonas em bactérias Gram-negativas e a Topoisomerase IV é o alvo principal da droga em bactérias Gram-positivas. (HOOPER, 1999). O papel dessas duas enzimas é resumido na figura 8.



**Figura 6:** Introdução de superenovelamento em uma molécula circular de DNA pela ação da DNA Girase, através da quebra das duas fitas, torção e religação pelo outro lado. Fonte MADIGAN et al., 2004.



**Figura 7:** Exemplo da introdução de superenovelamento positivo, pela separação de duas fitas em uma estrutura helicoidal. Enrolar duas fitas de borracha em dupla hélice, fixar uma das extremidades e puxar separando as duas fitas. A tensão resultante produz um superenovelamento. Fonte: LEHNINGER, 2006.



**Figura 8:** Efeito das quinolonas na atividade da DNA Girase e da Topoisomerase IV. Durante o metabolismo dos ácidos nucleicos o DNA circular bacteriano passa por estados de relaxamento e superenovelamento, controlados pela DNA Girase. À medida que o cromossomo é duplicado durante o processo de replicação, as duas fitas filhas são separadas pela Topoisomerase IV. Fonte: adaptado de HOOPER, 1999.

#### 1.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS E DERIVADOS

A resistência aos antimicrobianos é adquirida pelos micro-organismos de várias maneiras: mutações, transferência horizontal de genes (plasmídeos, transposons e bacteriófagos), recombinação com DNA exógeno, através de conjugação. Nas últimas três décadas, tem havido uma série de relatos na literatura sobre o uso inadequado de antimicrobianos e da propagação de resistência bacteriana entre os micro-organismos causadores de infecções do trato urinário (MANIKANDAN et al., 2011). Os vários mecanismos de resistência relatados na literatura podem ser de origem cromossomal ou plasmidial e serão discutidos mais adiante.

A resistência bacteriana contra quinolonas se resume a dois mecanismos: alterações nos alvos das quinolonas devido a mutações que ocorrem nas topoisomerasas e a diminuição do acúmulo da droga no interior da bactéria (RUIZ, 2003). A expressão ou superexpressão de transportadores de membrana promovem o fluxo da droga para fora da célula. Ainda, alteração na capacidade das drogas penetrarem na célula bacteriana está associada a uma redução no número de

proteínas porinas que permitem a entrada das fluorquinolonas na bactéria (HOOPER, 2001).

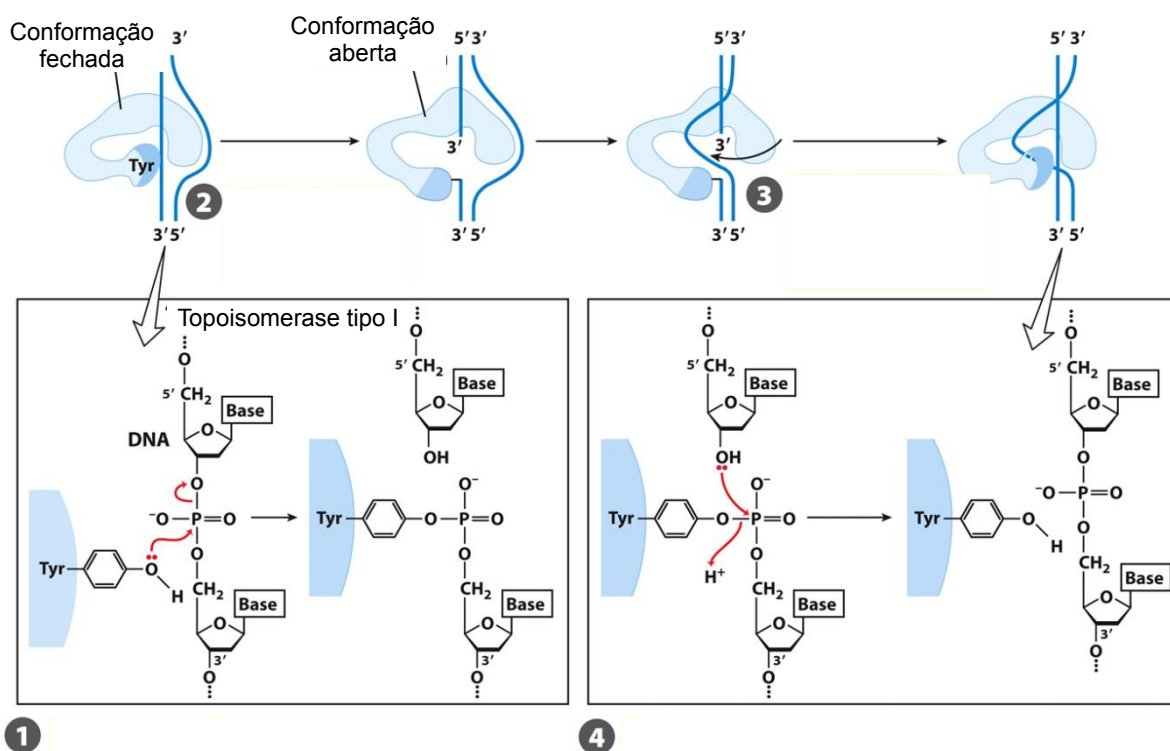
Elementos móveis (plasmidiais) têm sido descritos como determinantes de resistência a quinolonas como os genes *qnr's*. Estes elementos têm o potencial de transferência horizontal entre as bactérias, da resistência a quinolonas (RUIZ, 2003). Outros mecanismos plasmidiais envolvidos na resistência são: o gene de uma aminoglicosídio-acetiltransferase *aac(6')-Ib-cr* e as bombas de efluxo OqxAB e QepA. Os mecanismos cromossomais e plasmidiais serão detalhados adiante.

#### 1.4.1. MECANISMOS CROMOSSOMAIS

##### 1.4.1.1. ALTERAÇÕES NAS ENZIMAS ALVO

Conforme descrito anteriormente, as quinolonas agem diretamente sobre as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV. Assim, a ocorrência de mutações nos genes que codificam essas enzimas pode levar a alterações estruturais que interfiram na interação droga-enzima-DNA. Em Gram-negativos as mutações que conferem resistência são observados mais frequentemente em *gyrA* e *gyrB*, e em Gram-positivos em *parC* e *parE*. Em *E. coli* mutações também ocorrem na Topoisomerase IV, pois essa enzima é o alvo secundário das quinolonas em Gram-negativos (BLANCHE, 1996). Essas duas enzimas apresentam similaridade na sequência de aminoácidos. Especificamente, 36% dos aminoácidos de *parC* são idênticos aos de *gyrA* e 40% dos aminoácidos de *parE* são idênticos aos *gyrB* (KATO, 1990).

Uma mutação na subunidade A da DNA Girase manifesta-se pela produção de DNA Girases modificadas que não sofrem inibição pelas drogas. As mutações que ocorrem em *gyrA* relacionadas com resistência são observadas entre os códons 67 e 106 do gene, chamada de região determinante de resistência a quinolonas (QRDR). Esta região se encontra próximo a porção N-terminal da subunidade *gyrA* e perto do aminoácido Tyr122, que é o local de ligação do DNA com a enzima (YOSHIDA et al., 1990). A figura 9 mostra um modelo da sequência de reações de uma topoisomerase do tipo I, de procarioto. A figura 10 ilustra a ação de uma topoisomerase do tipo II.

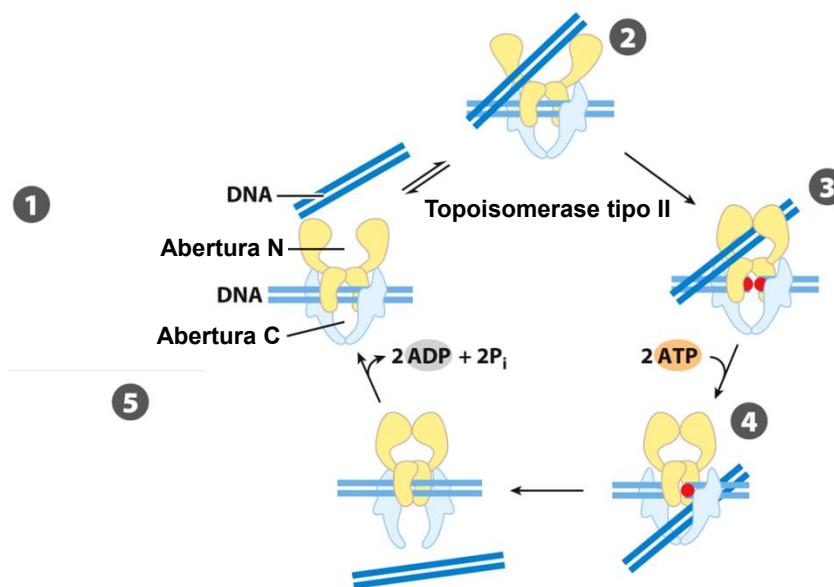


**Figura 9:** Ação de uma topoisomerase do tipo I. Este tipo de topoisomerase quebra apenas uma das fitas do DNA. **(1)** Depois de se ligar ao DNA, uma Tyr do sítio ativo ataca uma ligação fosfodiéster em uma fita do DNA, clivando-a e criando uma ligação covalente proteína-Tyr-DNA e liberando o nucleotídeo adjacente. **(2)** A enzima muda para uma conformação aberta. **(3)** A fita não quebrada passa sobre a quebra na primeira fita. **(4)** Com a enzima na conformação fechada, o grupo 3'-hidroxila liberado ataca a ligação proteína-Tyr-DNA para religar a fita clivada. Fonte: LEHNINGER, 2006.

Quando ocorre mutação no códon Ser-83 de *gyrA* esta leva a um alto nível de resistência ao ácido nalidíxico e baixa a ciprofloxacina. No entanto, uma mutação complementar em Asp-87 do mesmo gene tem um papel no desenvolvimento de alto nível de resistência a ciprofloxacina (VILA et al., 1994).

O trabalho de Yoshida e colaboradores (1990) analisa a influência de mutações na subunidade A da DNA Girase, comparando a concentração inibitória mínima (CIM) (0,0125 µg/mL) a ciprofloxacina de uma cepa selvagem de *E. coli*, com linhagens selecionadas com ácido nalidíxico e ácido pipemídico. Uma mudança de Ser para Leu ou Trp no códon 83 aumenta a CIM para 0,39 µg/mL, de Asp para Asn no códon 87 a concentração aumenta para 0,2 µg/mL, nos códons 81 e 84 a troca de aminoácidos aumenta a CIM para 0,1 µg/mL, e nos códons 67 e 106 a troca de aminoácidos aumenta a CIM para 0,5 µg/mL. Nota-se, portanto, que dependendo do local dentro da região QRDR, onde ocorre a mutação, há uma maior ou menor

influência na resistência dessas cepas. Na área em volta do aminoácido 83 do tipo selvagem da subunidade A, com Ser-83 é provável que se forme uma volta, como uma estrutura secundária local, mas a subunidade A mutante com Leu-83 ou Trp-83 pode formar uma  $\alpha$ -hélice como previsto por análise em computador. Além disso, o perfil hidrofóbico desta área é alterado significativamente pela mutação de Ser-83 para Leu ou Trp (YOSHIDA, 1990).



**Figura 10:** Mecanismo proposto para a reação de uma topoisomerase do tipo II. (1) As múltiplas subunidades da enzima ligam-se a uma molécula de DNA (azul claro). (2) Um segundo segmento do mesmo DNA (azul escuro) é ligado à abertura N. (3) O segundo segmento de DNA (azul escuro) é preso. O segmento azul claro é clivado nas duas fitas, da mesma forma como ocorre na figura 9. (4) O segmento azul escuro passa pela quebra. (5) O segmento clivado é religado e o segundo segmento é liberado por meio da abertura C. Fonte: LEHNINGER, 2006.

A Topoisomerase IV de *E. coli* é também inibida pelas quinolonas, porém, com concentração abaixo das que inibem a DNA Girase. A resistência mediada por mutação também tem sido relatada em regiões conservadas de *parC* e *parE*, homólogas as de *gyrA* e *gyrB* respectivamente. Em ambos os casos, as mutações em *parC* e *parE* contribuem para aumentar a resistência em cepas que apresentam mutação em *gyrA*. Mutações em *parC*, que ocorrem em *gyrA* selvagem, não conferem resistência a estas cepas (HOOPER, 1998).

Em *E. coli*, e entre outros micro-organismos, as mutações em *parC* mais comuns ocorrem nos aminoácidos Gly-78, Ser-80 e Glu-84 que são análogos aos códons Gly-81, Ser-83 e Asp-87 de *gyrA* (EVERETT, 1996; RUIZ, 2003).

#### 1.4.1.2. DIMINUIÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR

Para alcançar a DNA girase e a Topoisomerase IV no citoplasma, as quinolonas devem atravessar a parede celular, a membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas e, adicionalmente, a membrana externa de bactérias Gram-negativas. A parede celular não interfere ou interfere muito pouco na passagem da droga (HOOPER, 1999). A membrana externa de Gram-negativos é atravessada de duas formas: por meio de porinas específicas ou por difusão através da bicamada fosfolipídica. O grau de difusão de uma quinolona está grandemente associado e dependente, do seu nível de hidrofobicidade (RUIZ, 2003).

Todas as quinolonas podem atravessar a membrana externa através das porinas, mas apenas aqueles com um maior grau de hidrofobicidade podem difundir-se através da bicamada lipídica. Assim, alterações na composição das porinas e / ou nos lipopolissacarídeos podem alterar os perfis de suscetibilidade (RUIZ, 2003). Em mutantes defeituosos de lipopolissacarídeo, foi descrito aumento da suscetibilidade às quinolonas hidrofóbicas, sem alterações no nível de resistência às quinolonas hidrofílicas (HIRAI et al., 1986).

A resistência a fluoroquinolonas em bactérias Gram-negativas está associada com reduções em porinas e diminuição da concentração citoplasmática das drogas, porém, as reduções dessas proteínas sozinhas não são geralmente suficientes para explicar a resistência (HOOPER, 2001).

A membrana externa de *E. coli* possui três porinas principais (OmpA, OmpC e OmpF). Uma diminuição no nível de expressão de OmpF está relacionada com um aumento da resistência a algumas quinolonas, mas não afeta a CIM de outros, tais como tosufloxacin ou esparfloxacina. Por outro lado, uma diminuição da expressão de OmpF resulta na diminuição da suscetibilidade a uma variedade de agentes antibacterianos tais como  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas e cloranfenicol. Os níveis de OmpF são regulados por dois *operons*: MarRAB (constituído por três genes: *marR*, que codifica uma proteína repressora, *marA*, que codifica um ativador transcricional e *marB* que codifica uma proteína com função desconhecida) ou SoxRS (este *operon* codifica para duas proteínas, SoxR, uma proteína reguladora, e SoxS, um ativador transcricional) (RUIZ, 2003).

#### 1.4.1.3. SUPEREXPRESSÃO DE BOMBAS DE EFLUXO

Mais recentemente, a resistência causada pela diminuição intracelular dos antimicrobianos tem sido demonstrada pela presença e superexpressão de sistemas de efluxo endógenos, que bombeiam ativamente a droga para fora do citoplasma. Em bactérias Gram-negativas, estes sistemas têm tipicamente três componentes: a bomba de efluxo localizadas na membrana citoplasmática, uma proteína na membrana externa e uma proteína de ligação entre estas duas que passa pelo espaço periplasmático. Este sistema ativamente expulsa a droga a partir do citoplasma para o exterior da célula, a energia para este processo é derivada do gradiente de prótons através da membrana (HOOPER, 2001).

Tais sistemas de efluxo são tipicamente capazes de causar resistência a compostos de diversos tipos estruturais e, portanto, são referidas como bombas de multirresistência. Eles parecem estar presentes em muitas, se não em todas as bactérias. Os substratos naturais para esses sistemas são geralmente desconhecidos, mas os modelos atuais preveem um papel geral na remoção de compostos tóxicos da célula (HOOPER, 2001).

Em *E. coli*, os *operons* MarRAB e SoxRS além de regular a expressão de OmpF, regulam também, o nível de expressão dos sistemas de bombas de efluxo tais como AcrAB. Mutações que afetam MarR induzem a expressão constitutiva deste *operon*, levando ao desenvolvimento de um fenótipo de multirresistência (RUIZ, 2003).

#### 1.4.2. MECANISMOS PLASMIDIAIS

##### 1.4.2.1. DETERMINANTES QNRs (QUINOLONE RESISTANCE)

Como discutido anteriormente os principais mecanismos de resistência as quinolonas são o acúmulo de mutações ocorridas nos genes alvo das quinolonas (DNA Girase e Topoisomerase IV). Uma dupla mutação nesses genes é evento raro de acontecer ( $10^{-14}$  –  $10^{-16}$ ) e outros fatores devem assegurar o acúmulo dessa resistência, como a presença de plasmídeos, contendo genes com mecanismos de resistência, que garantam a sobrevivência da bactéria pela diminuição da suscetibilidade frente ao antimicrobiano e permita assim que as mutações ocorram

sequencialmente ao invés de simultaneamente. Um ponto importante desses elementos é que eles podem ser transferidos horizontalmente entre as linhagens bacterianas (STRAHILEVITZ et al., 2009), contribuindo para a evolução dessas cepas.

O primeiro relato de resistência mediada por plasmídeo (PMQR) foi observado em 1994 quando Martinez-Martinez e colaboradores estudando um plasmídeo (pMG252) portador de multirresistência a  $\beta$ -lactâmicos, inesperadamente notaram que quando este era transferido a *E. coli*, em meio seletivo contendo uma quinolona, conferia a bactéria um aumento na concentração inibitória mínima (CIM) de 8 a 64 vezes. Esse plasmídeo era proveniente de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, isolada da urina de um paciente nos Estados Unidos. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que a transferência do plasmídeo a cepas sensíveis a quinolonas não conferia a estas resistência, apenas aumentava a CIM das que já eram resistentes. A designação *qnr* foi proposta para os genes envolvidos nesse mecanismo de resistência plasmidial (MARTINEZ-MARTINEZ, 1998).

O produto do gene *qnr* é uma proteína com 218 aminoácidos pertencente a uma família de pentapeptídeos repetidos (PRP), que protege a DNA Girase da inibição pelas quinolonas (TRAN & JACOBY, 2002). O mecanismo de ação das Qnr vem sendo estudado e sabe-se que elas têm um efeito protetor da DNA Girase e da Topoisomerase IV. Alguns ensaios *in vitro* com a proteína QnrA (a primeira de muitas variantes) purificada revelaram que sua atividade se dá pela interação com a DNA Girase e Topoisomerase IV que minimiza as oportunidades para a formação do complexo letal DNA girase-DNA-quinolona. No entanto, como a QnrA se liga a DNA Girase sem inibir sua atividade, ainda não se sabe (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Desde a descoberta do primeiro gene *qnr* chamado *qnrA*, vários outros alelos foram também descritos, *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, and *qnrVC* (STRAHILEVITZ et al., 2009). Até hoje, para o gene *qnrA* foram encontrados sete variantes, tanto em bactérias patogênicas quanto em bactérias ambientais. No ano de 2003, no Japão, foi descoberto o gene *qnrS* (HATA et al., 2005) e oito variantes para esse alelo foram encontrados, também provenientes de cepas patogênicas e ambientais. Em 2006 na Índia, foi encontrado o gene *qnrB* (JACOBY et al., 2006), o qual possui 62 variantes, o maior número até hoje encontrado. Na China, em 2009, foram descobertos ambos os genes *qnrC* e *qnrD* os quais ainda não possuem variantes encontrados (WANG et

al., 2009; CAVACO et al., 2009). Diante de tantos alelos, Jacoby e colaboradores propuseram uma organização na nomenclatura e nas sequências depositadas no GenBank para melhorar a confiabilidade e acessibilidade dos dados e assim foi disponibilizado um site para consulta, <<http://www.lahey.org/qnrStudies>>, que vem sendo permanentemente atualizado pelo grupo de pesquisadores (JACOBY et al, 2008).

As famílias das Qnr são definidas por uma diferença de 30% ou mais nos aminoácidos. Dentro de cada família, um alelo difere de outro em um aminoácido ou mais (JACOBY et al., 2008). O mecanismo de ação das Qnr pelo efeito protetor da DNA girase e da Topoisomerase IV produz apenas um efeito de aumento da CIM de quinolonas e fluorquinolonas. Cepas resistentes possuem mais um mecanismo de ação envolvido, além das proteínas Qnr, e assim como alguns outros mecanismos acima citados, este é um contribuinte, porém não o principal, para a resistência a quinolonas (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2003).

A importância dos genes *qnr* para o aparecimento de cepas resistentes consiste no fato de, por sua natureza, levarem a baixos níveis de resistência, ou seja, apenas a um aumento na CIM. Justamente por esse motivo, eles agem como agentes facilitadores da seleção de estirpes com mutações em genes cromossomais na presença de quinolonas (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2003). Estudos recentes demonstraram a presença de mais de um gene *qnr* numa mesma bactéria, porém, não há indícios de um efeito aditivo que resultasse num aumento da CIM, o que sugere a possibilidade de haver uma competição das proteínas Qnr pela ligação à DNA Girase (HU et al., 2008)

#### 1.4.2.2. DETERMINANTES AAC (6')-ib-cr

Um trabalho publicado em 2006 por Robicsek e colaboradores relata a presença de transconjugantes provenientes da China, contendo plasmídeos *qnrA*, apresentando valores de CIM mais altos dos que normalmente são observados em isolados clínicos apresentando esses genes. Experimentos demonstraram a não ocorrência de superexpressão desses genes, nem o aumento de cópias dos plasmídeos nas células. Nesses plasmídeos foi descoberta uma variante da enzima aminoglicosídio acetiltransferase, codificada pelo gene *aac(6')-Ib* que estava envolvida com o aumento da CIM de ciprofloxacina e norfloxacina. Essa nova

variante designada *aac(6')-Ib-cr*, do inglês *ciprofloxacin resistance*, promove a acetilação do radical amino piperazinil, presente em ciprofloxacina e norfloxacina, culminando na perda de função dos fármacos (ROBICSEK et al., 2006).

O aumento da CIM conferido pela AAC(6')-Ib-cr é menor que aquele gerado pelas proteínas Qnrs, porém tem sido reportado que o gene em questão tem aparecido em associação com outros genes plasmidiais de resistência a quinolonas, bem como com  $\beta$ -lactamases em especial em *E. coli*. (SHIN et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Um trabalho de Pitout e colaboradores (2008) mostrou que 57% das amostras estudadas resistentes a ciprofloxacina eram portadoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) e desde 2005 essas *E. coli* têm sido as mais comuns em isolados clínicos naquela região do Canadá. No Brasil a variante *aac (6')-ib-cr* foi reportada pela primeira vez em 2012, em Belo Horizonte, MG. O gene foi encontrado em *E. coli*, isoladas de urina de mulheres diagnosticadas com ITU (PAIVA et al, 2012).

#### 1.4.2.3. BOMBAS DE EFLUXO OqxAB e QepA

Mecanismos de efluxo podem atuar sobre um único, ou múltiplos antimicrobianos e os genes que os codificam, podem estar em plasmídeos ou no cromossomo. Tais mecanismos têm sido descritos e são cada vez mais reconhecidos como importantes determinantes de resistência antimicrobiana numa variedade de organismos. Em bactérias Gram-negativas, a resistência a quinolonas mediada por bombas de efluxo é em grande parte realizada por transportadores de multirresistência, codificados por genes endógenos cromossomais. Esta família de bombas de efluxo tradicionalmente cromossômicas é ubíqua em bactérias Gram-negativas, e como descrito anteriormente, serve para remover os compostos indesejados a partir do citoplasma e membrana plasmática. Dois destes sistemas que conferem resistência a quinolonas foram reportados sendo transportados em plasmídeos: OqxAB e, mais recentemente, QepA.

Em 2002 foi descoberto um plasmídeo conjugativo, pOLA52 que conferia resistência ao antibiótico olaquinox (um derivado da quinoxalina, que é utilizado como um promotor de crescimento em animais de produção) em cepas de *E. coli* isoladas a partir de estrume suíno. O mecanismo de resistência foi identificado como sendo uma bomba de efluxo OqxAB, que confere resistência a várias drogas

(SØRENSEN, 2003). A bomba de efluxo OqxAB confere resistência ou reduz a suscetibilidade a uma variedade de substratos em *E. coli*. Estes incluem os promotores de crescimento de animais, agentes antimicrobianos (incluindo ciprofloxacina, ácido nalidíxico e norfloxacina), desinfetantes e detergentes. Ainda, pode ser facilmente transferida para enterobactérias patogênicas por conjugação (HANSEN, 2007). Recentemente, os genes para a bomba de efluxo OqxAB foram encontrados em isolados clínicos humanos na Coréia do Sul, em um plasmídeo em *E. coli* e no cromossomo de *Klebsiella pneumoniae*, com uma frequência de 74% das amostras positivas para os genes OqxAB estudadas, sugerindo ser este o reservatório do gene naquela região (KIM, 2009).

Uma nova bomba de efluxo QepA foi encontrada em um plasmídeo pHPA, descoberto em uma cepa de *E. coli* isolada de uma amostra de urina de um paciente em Hyogo, Japão, em 2002. Este plasmídeo exibia um perfil de resistência múltipla para aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, e  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro. Interessantemente, uma análise filogenética mostra que estes genes pertencem a uma família de transportadores de membrana de Gram-positivos (Ordem Actinomycetales) e não de Gram-negativos, onde foram encontrados inicialmente (YAMANE, 2007). Desde a sua descoberta, uma variante do gene *qepA* possuindo duas substituições de aminoácidos foi encontrada. Esta variante (nomeada QepA2) confere um fenótipo semelhante ao do determinante QepA (agora denominada QepA1) (CATTOIR et al., 2008).

#### 1.4.3. OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A QUINOLONAS ASSOCIADOS AOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS

Um dos principais grupos de antibióticos de aplicação clínica corresponde aos  $\beta$ -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenems, e inibidores de  $\beta$ -lactamases combinados a um  $\beta$ -lactâmico (PITOUT et al., 1997). Estes têm em comum a presença de um componente estrutural característico, o anel  $\beta$ -lactâmico (MADIGAM et al., 2004). Tais drogas são potentes inibidores da síntese de parede celular. As enzimas que catalisam essa atividade (as transpeptidases) são também capazes de se ligar aos antibióticos que contêm o anel  $\beta$ -lactâmico, deixando de catalisar a reação de transpeptidação, enfraquecendo a estrutura do peptídeoglicano. As transpeptidases pertencem a uma família de enzimas

conhecidas como proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). Essas proteínas estão inseridas na membrana celular das bactérias e em Gram-negativas expõem o sítio de ligação no espaço periplasmático (espaço entre a membrana plasmática e a parede celular). Os  $\beta$ -lactâmicos ligam-se covalentemente as PBPs inibindo sua ação, que leva a lise da parede celular e morte da bactéria (PITOUT et al, 1997).

Em bactérias Gram-negativas a produção de  $\beta$ -lactamases continua sendo o mais importante mecanismo de resistência contra agentes  $\beta$ -lactâmicos (PITOUT e LAUPLAND, 2008).  $\beta$ -lactamases são enzimas que clivam a anel  $\beta$ -lactâmico, tornando a droga ineficaz (BONNET, 2004).

As  $\beta$ -lactamases apresentaram uma evolução com o tempo, principalmente devido à pressão seletiva realizada através do intenso uso de antibióticos, como as cefalosporinas de segunda e terceira geração. Um grupo especial de  $\beta$ -lactamases são as  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL), estas enzimas são capazes de conferir resistência através da hidrólise de penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações e também ao aztreonam (monobactam), porém não são capazes de hidrolisar cefalosporinas de quarta geração (cefamicinas) e carbapenems. Além disso, as ESBL são hidrolisadas por inibidores de  $\beta$ -lactamases como o ácido clavulânico (PATERSON & BONOMO, 2005).

Quanto à origem, essas enzimas (ESBL) evoluíram por mutações das  $\beta$ -lactamases TEM-1, SHV-1 e TEM-2 com seus genes presentes em plasmídeos, mas podem ter sido derivadas de uma enzima cromossomal. Substituições de apenas um ou poucos aminoácidos, tem implicações profundas suficientes para ampliar sua resistência. Organismos que produzem ESBLs constituem um importante fator na falha do controle de infecções utilizando as cefalosporinas (PITOUT & LAUPLAND, 2008; BUSH & JACOBY, 2010).

O primeiro relato de uma ESBL ocorreu na Alemanha em 1983 e foi obtida a partir de uma estirpe de *Klebsiella ozaenae*, recebendo o nome de SHV-2, derivada da ancestral SHV-1 por uma mutação em um único nucleotídeo (Gln por Ser na posição 238) (KNOTHE, 1983). A maioria das ESBLs são codificadas por genes localizados em grandes plasmídeos, que geralmente carregam genes de resistência a outros antimicrobianos, tais como aminoglicosídeos, trimetoprim, sulfonamidas, tetraciclina e cloranfenicol (PITOUT et al., 2005).

No ano de 1990, Bauernfeind e colaboradores reportaram uma nova enzima ESBL: a CTX-M. Ela hidrolisa fortemente o Cefotaxime e aumenta a CIM para o

Ceftazidime. Cepas carreadoras de ESBL tipo CTX-M emergiram rapidamente e atualmente estão presentes em todo o mundo, principalmente em bactérias causadores de infecções comunitárias. Pacientes ambulatoriais, trabalhadores de hospitais e clínicas, além de pessoas que cuidam de idosos, podem ser os carreadores dos genes *bla*CTX-M, da comunidade para o hospital (DALMARCO, 2006). As CTX-M não são muito relacionadas com as  $\beta$ -lactamases mais comuns TEM e SHV, com apenas 40% de semelhanças. Estas enzimas estão muito mais relacionadas, com até 77% de homologia, com a AmpC de bactérias do gênero *Kluyvera*, sugerindo uma diferente origem destas  $\beta$ -lactamases (BRADFORD, 2001).

Nos últimos anos houve um esforço maior na exploração de novas ESBL como as famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA E BES resultando em mais de 370 variantes hoje conhecidas. A evolução das ESBLs é tão grande que um web site (<http://www.lahey.org/studies>) foi criado para tentar manter certa ordem no que diz respeito à nomenclatura a ser utilizada nas novas descobertas (DALMARCO, 2006; BUSH & JACOBY, 2010).

Apesar do foco do referente trabalho ser os mecanismos de resistência a quinolonas e fluorquinolonas, vários trabalhos têm demonstrado a presença de (ESBLs) em cepas resistentes a quinolonas, promovendo multirresistência a estes isolados (JIANG, 2008; MA, 2009). Isso demonstra a importância de se pesquisar tais fenótipos associados à UPEC.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar molecularmente os padrões de resistência a quinolonas e fluorquinolonas em linhagens de *E. coli* uropatogênica.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar por métodos bioquímicos os biótipos de *E. coli* isolados de amostras de urina.
2. Avaliar “in vitro” os padrões de resistência dos isolados clínicos, aos antimicrobianos quinolonas, fluorquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos por testes de difusão do disco.
3. Traçar um perfil epidemiológico das amostras coletadas.
4. Verificar a presença mútua de resistência a  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

Os meios de cultura Ágar MaConkey, Ágar Mueller Hinton e Base de Ágar Sangue foram obtidos da BD<sup>®</sup> (Sparks, MD, EUA). O Ágar Triptona de Soja (TSA) e Caldo BHI foram obtidos da Himedia<sup>®</sup> (Mumbai, Índia). Todos preparados seguindo as especificações do fabricante. Além destes, foi usado o Kit para identificação de Enterobactérias e os discos de antimicrobianos da Newprov (Pinhais, PR, Brasil).

Os sais utilizados foram: Cloreto de Sódio da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), Tris base da Amresco (Solon, Ohio, EUA), EDTA da Biosolve (Valkenward, Holanda), Acetato de Amônio e Cloreto de Magnésio da USB (Cleveland, Ohio, EUA).

Os demais reagentes foram: Glicerol da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), Ácido Acético glacial e Ácido Clorídrico P.A. da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), Etanol da Panreac (Barcelona, Espanha), Brometo de Etídeo da Invitrogen (Carlsbad, California, EUA).

Os reagentes e enzimas de uso para biologia molecular foram: dNTP e Taq DNA polimerase da Invitrogen (Carlsbad, California, EUA), os oligonucleotídeos iniciadores da IDT (Coralville, Iowa, EUA), Agarose da Conda (Madrid, Espanha), Exonucleasel da Biolabs (Ipswich, New England), Fosfatase Alcalina da USB (Cleveland, Ohio, EUA) e BigDye da Applied Biosystems (Carlsbad, California, EUA).

#### 3.2. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram Estufa Bacteriológica e Balança Analítica Q500L 210C da Quimis (Diadema, SP, Brasil), Balança semi-analítica BL 3200H da Shimadzu (Kyoto, Japan), Cabine de Segurança Biológica Classe II da Veco, (Campinas, SP, Brasil), Centrífuga MCD2000 da HT (Shangai, China), Termociclador Mastercycler Gradiente da Eppendorf (Hamburg, Alemanha), Transiluminador M20 da UVP (Upland, CA, EUA), Agitador da Arthur H. Thomas (Philadelphia, Pennsylvania, EUA), Sequenciador 3500xL da Applied Biosystems (Carlsbad, California, USA).

### 3.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram analisadas 55 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina de pacientes hospitalizados e da comunidade com suspeita de infecção urinária. Tal material foi doado por um laboratório de análises clínicas da cidade de Curitiba (LANAC), coletadas entre os meses de Junho e Outubro de 2011. As amostras foram recebidas do laboratório em placas de ágar CLED.

### 3.4. METODOLOGIA

#### 3.4.1. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS E IDENTIFICAÇÃO

As cepas isoladas foram identificadas e testadas quanto à suscetibilidade a vários antimicrobianos no laboratório de origem. Para a realização do presente estudo, as amostras foram novamente identificadas para a certificação da espécie e determinação do biótipo. Para isso foram semeadas em Ágar MacConkey pelo método de esgotamento da alça e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas, a fim de se avaliar a pureza das amostras e eliminação de uma possível microbiota de acompanhamento.

As colônias isoladas em Ágar MacConkey foram submetidas ao teste de identificação, utilizando provas bioquímicas convencionais através do Kit para Enterobacterias (Newprov). Tal método testa a capacidade da bactéria de metabolizar vários tipos de substratos e desta forma, através de uma tabela fornecida pela própria Newprov, identificar a cepa ao nível de espécie. Em seguida, as cepas foram repicadas em meio TSA ou Base de Ágar Sangue e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C. Após o crescimento uma alçada da massa bacteriana foi dissolvida em caldo BHI acrescido de glicerol a 15% e armazenada a -20°C. Somente as amostras confirmadas como *E. coli* pela série bioquímica e livres de contaminantes foram incluídas no presente estudo.

#### 3.4.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para a realização do Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, as cepas foram descongeladas e repicadas em meio TSA ou Base de Ágar Sangue e

incubadas por 18 a 24 horas a 37°C. O teste foi realizado segundo o método de Kirby-Bauer, padronizado pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2005). Os antimicrobianos selecionados da classe das quinolonas foram o Ácido Nalidíxico (Nal), Ciprofloxacina (Cip), Norfloxacina (Nor) e Ofloxacina (Ofx).

Para a triagem das enzimas ESBL's foram testados os antimicrobianos beta-lactâmicos Amoxicilina com Ácido Clavulânico (Amc), Cefotaxima (Ctx), Ceftazidima (Caz) e Aztreonam (Atm) pelo método de disco aproximação (JARLIER et al., 1988).

### 3.4.3. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A detecção dos genes relacionados à resistência a quinolonas foi realizada amplificando-se parte destes genes pelo método de PCR Multiplex, utilizando-se como molde o DNA de uma colônia bacteriana isolada em placa.

Para isso, cada amostra foi repicada em meio Ágar MacConkey pelo método de esgotamento da alça e incubada a 37°C por 18 a 24h. Certa quantidade da massa bacteriana foi retirada, a partir de uma colônia, com auxílio de um palito de dente estéril e colocada em um microtubo de 0,2mL, acrescido de 15µL de água MiliQ autoclavada. Esse sistema foi submetido a 95°C por 15min, para permitir a lise do revestimento celular e a liberação do material genético bacteriano. Em seguida, foi adicionada a mistura de reação para um volume final de 30µL, composta por: água MiliQ autoclavada, solução tamponante de reação (10X) na concentração final de 1X, Cloreto de Magnésio (50mM), concentração final 2,5mM, *Taq* DNA polimerase na concentração de 0,025U/µL, os quatro nucleotídeos dNTP (Invitrogen) (10mM), concentração final 0,2mM e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (IDT) a 0,2µM cada, com exceção do *primer* ParC a 0,4µM.

Os *primers* foram selecionados a partir da literatura consultada. O par de GyrA e o de ParC anelam no gene flanqueando e amplificando a região QRDR, onde se encontram as principais mutações responsáveis pela resistência a nível cromossomal (YOSHIDA et al., 1990). Já os pares Qnr's e aac(6')-ib-cr são responsáveis pela amplificação de genes presentes em plasmídeos relacionados com o mecanismo de resistência (MARTINEZ-MARTINEZ, 1998; ROBICSEK et al., 2006). As sequências dos *primers* estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Sequência dos pares de *primers* utilizados para a PCR Multiplex. O tamanho em pb (pares de bases) do *amplicon* (fragmento do gene amplificado) gerado por cada par. Referência do trabalho de onde cada par foi selecionado. (F) = forward, (R) = reverse.

| Primer           | Sequência                      | pb  | Referência                 |
|------------------|--------------------------------|-----|----------------------------|
| GyrA F           | AAA TCT GCC CGT GTC GTT GGT    | 344 | Rodrigues & Martinez, 2006 |
| GyrA R           | GCC ATA CCT ACG GCG ATA CC     |     |                            |
| ParC F           | GTA TGC GAT GTC TGA ACT        | 230 | Cattoir, 2006              |
| ParC R           | TTC GGT GTA ACG CAT TGC        |     |                            |
| aac (6')-lb-cr F | TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA | 482 | Hye, 2006                  |
| aac (6')-lb-cr R | CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT     |     |                            |
| QnrS F           | ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA     | 417 | Robicsek, 2006             |
| QnrS R           | TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC     |     |                            |
| QnrB F           | ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA     | 600 | Rios, 2007                 |
| QnrB R           | GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT     |     |                            |
| QnrA F           | AAG GAA GCC GTA TGG ATA TT     | 670 | Jiang, 2008                |
| QnrA R           | AGC TAA TCC GGC AGC ACT AT     |     |                            |

As condições para PCR foram: um ciclo de 95°C por 2 min e 35 ciclos de 95°C por 30s, 55,4°C por 60s e 72°C por 60s.

#### 3.4.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese, aplicando-se 10µL do produto de PCR em gel de agarose a 2%, com 60 volts de ddp, durante 2 horas de corrida em TAE 1x (Tris 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM). A visualização dos amplicons foi realizada sob luz ultravioleta (254nm), após tratamento do gel com brometo de etídio 0,5µg/mL durante 30 minutos sob agitação, seguidos de 5 minutos de tratamento com água para remoção do excesso de brometo de etídio.

#### 3.4.5. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS DA PCR

Após a certificação da amplificação (resultado positivo na eletroforese), os 20µL restantes do produto da PCR foram submetidos a tratamento com 0,5 µL de Exonuclease I (Biolabs) a 20U/ µL e 1,0 µL de Fosfatase Alcalina (SAP) (USB) a

1U/ $\mu$ L por 90min a 37°C. Tais enzimas purificam o produto da PCR por degradarem respectivamente os oligonucleotídeos e os dNTP's que tenham sobrado na reação. As enzimas são então inativadas encubando-se o sistema a 80°C por 30 min. As amostras purificadas foram conservadas a -20°C.

#### 3.4.6. SEQUENCIAMENTO

Os genes isolados e amplificados foram sequenciados, utilizando-se o Kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing. Após o tratamento com Exonuclease I e SAP, as amostras foram submetidas a uma nova PCR e esta destinada ao sequenciamento. Em um volume final de 10 $\mu$ L de reação, foi adicionado solução tamponante [Tris-HCL (pH 9) 80mM, Cloreto de Magnésio 2 mM] (3 $\mu$ L), BigDye (1 $\mu$ L), Primer (0,5 $\mu$ L a 10pmol/ $\mu$ L), DNA purificado (5 $\mu$ L) proveniente da PCR multiplex tratada e 0,5 $\mu$ L de água MiliQ autoclavada. Em seguida, esse sistema foi submetido à nova PCR nas seguintes condições: um ciclo de 96°C por 2 min e 35 ciclos de 96°C por 45s, 55,4°C por 30s e 60°C por 4min.

Na sequência, foi realizada a precipitação do produto da PCR, adicionando aos 10  $\mu$ L do amplificado para sequenciamento: 2 $\mu$ L de acetato de amônio 7,5M, 60 $\mu$ L de etanol absoluto e 10 $\mu$ L de água MiliQ autoclavada, seguido de centrifugação a 14000 rpm, por 45 min. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionado 150 $\mu$ L de etanol 70% e centrifugado na mesma rotação do passo anterior por 10min. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco por uma hora ao abrigo da luz e armazenado a -20°C.

As amostras assim preparadas foram então enviadas para a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e para a Universidade Federal do Paraná e através do sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems) foram obtidas as sequências dos genes isolados. As sequências obtidas foram analisadas através do programa Bioedit e comparadas àquelas depositadas no *GenBank* ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)).

## 4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico.

### 4.1. CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A FLUOQUINOLONAS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE URINA DE PACIENTES COM ITU

## RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU) apresentam grande ocorrência na população, afetando principalmente mulheres, idosos e gestantes. Na maioria dos casos uma ITU é causada por enterobactérias, especialmente *Escherichia coli*. Os principais antimicrobianos utilizados no tratamento das ITUs são as quinolonas e fluorquinolonas. Desde sua descoberta na década de 60, tais antimicrobianos foram aperfeiçoados aumentando seu espectro de ação, porém os micro-organismos também evoluíram desenvolvendo resistência a tais fármacos. A resistência se resume a dois mecanismos: alterações nos alvos das quinolonas e ou a diminuição da concentração da droga no interior da célula. Quinolonas são antimicrobianos que têm como alvo duas enzimas envolvidas na replicação e transcrição do DNA bacteriano, a DNA Girase, formada por duas subunidades GyrA e duas GyrB, produtos dos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente e a Topoisomerase IV, também composta de duas subunidades ParC e duas ParE, codificadas a partir dos genes *parC* e *parE*. Mutações nesses genes podem conferir alto nível de resistência a estes antimicrobianos. Outros mecanismos envolvem genes transportados em plasmídeos, como os *qnr's*, responsáveis pela produção de proteínas capazes de proteger as enzimas alvo das quinolonas. O gene *aac(6')-ib-cr*, também presente em plasmídeos, é capaz de alterar a estrutura química de certas fluorquinolonas interferindo na sua eficiência. A associação de resistência a quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos devido à presença de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs), tem sido amplamente relatada na literatura. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar os padrões de resistência a quinolonas e fluorquinolonas em 55 amostras de *E. coli* uropatogênica coletadas em Curitiba, PR, Brasil. A resistência ao ácido nalidíxico, a norfloxacin, ciprofloxacina e ofloxacina, foi observada em 69,1% das amostras. A análise molecular das cepas resistentes revelou mutações em *gyrA* (códon 83 e 87) e em *parC* (códon 80). Também foi pesquisada a presença dos genes *qnr's* e *aac(6')-ib-cr*. Duas das 55 amostras foram positivas para *aac(6')-ib-cr*. A presença desse gene no Brasil foi relatada pela primeira vez em 2012, em Belo Horizonte, MG. Nenhuma amostra foi positiva para os genes *qnr's*. Estes resultados mostram uma elevada incidência de resistência às quinolonas e a capacidade de disseminação da resistência adquirida horizontalmente entre as cepas bacterianas.

Palavras-chave: Resistência, quinolonas, mutação, *aac(6')-ib-cr*

## ABSTRACT

The urinary tract infections (UTI) have high incidence in the population, mainly affecting women, the elderly and pregnant women. In most cases an UTI is caused by Enterobacteriaceae, especially *Escherichia coli*. The main antimicrobials used in the treatment of UTIs, are the quinolones and fluoroquinolones. Since its discovery in the 60s, such antimicrobials were improved and increasing its spectrum of activity, but also the micro-organisms has evolved to develop resistance to these drugs. The resistance comes down to two mechanisms: changes in targets of quinolones or decreased concentration of the drug within the cell. Quinolones are antimicrobial agents that target two enzymes involved in transcription and replication of bacterial DNA, DNA Gyrase, consisting of two subunits GyrA and two GyrB products of the genes *gyrA* and *gyrB* respectively and Topoisomerase IV, also composed of two ParC and two ParE subunits, encoded from genes *parC* and *parE*. Mutations in these genes can confer high-level resistance to these antimicrobials. Other mechanisms involve genes carried in plasmids such as *qnr*'s, responsible for the production of proteins that protect the target enzymes of quinolones. The gene *aac (6')-Ib-cr* also present in plasmids can alter the chemical structure of certain fluoroquinolones interfering efficiency. The association of resistance to quinolones and  $\beta$ -lactams due to the presence of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) has been widely reported in the literature. The main objective of this study was to evaluate the patterns of resistance to quinolones and fluoroquinolones in 55 samples of uropathogenic *E. coli* collected in Curitiba, PR, Brazil. The resistance to nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin was observed in 69.1% of the samples. Molecular analysis of the resistant strains showed mutations in *gyrA* (codons 83 and 87) and *parC* (codon 80). Also investigated was the presence of genes *qnr*'s and *aac (6')-Ib-cr*. Two of the 55 samples were positive for *aac (6')-Ib-cr*. The presence of this gene in Brazil was first reported in 2012 in Belo Horizonte, MG. No samples were positive for the *qnr*'s genes. These results show a high incidence of resistance to quinolones and the ability to horizontally spread of acquired resistance between the bacterial strains.

Keywords: Resistance, quinolones, mutation, *aac (6')-Ib-cr*

## **INTRODUÇÃO**

Uma Infecção do trato urinário (ITU) refere-se à presença de patógenos microbianos nos órgãos que compõem este sistema, que normalmente é estéril. Geralmente classificadas pelo local da infecção como uretrite (uretra), cistite (bexiga) ou pielonefrite (rim). Quando ocorre na uretra ou na bexiga é considerada ITU inferior e pode, dependendo de fatores de virulência do patógeno ou condições predisponentes do hospedeiro, ascender para os ureteres e chegar aos rins causando uma pielonefrite (ITU superior). Uma ITU pode ser assintomática ou sintomática, caracterizada por um largo espectro de sintomas e sinais variando de micção irritativa leve, bacteremia, septicemia ou até complicações mais graves (FOXMAN & FRERICHS, 1985; MULVEY, 2002; ZORC et al., 2005).

As ITUs apresentam grande ocorrência na população, situando-se entre as infecções bacterianas mais frequentes que afetam o ser humano, principalmente mulheres, idosos, gestantes, hospitalizados e diabéticos (STAMM & HOOTON, 1993; WARREN et al., 1999).

Estima-se que aproximadamente 35% das mulheres saudáveis terão ao menos um episódio de ITU durante sua vida (LEE, 2007). No sexo feminino, a maior suscetibilidade à infecção é devida às condições anatômicas: uretra mais curta e a maior proximidade da vagina com o ânus. A atividade sexual e o uso de certos contraceptivos, como espermicidas, também parecem contribuir para ITU's (GRIEBLING, 2007). Mulheres com diabetes mellitus têm maior incidência de ITU. As gestantes também são mais susceptíveis, pois, durante a gravidez, o trato urinário passa por várias modificações que contribuem para este tipo de infecção (PATTERSON & ANDREOLI, 1997; RONALD & LUDWIG, 2001; STAPLETON, 2002).

Nos homens a incidência é baixa entre os jovens e aumenta drasticamente com o avanço da idade (GRIEBLING, 2007). Um estudo de Dias Neto e colaboradores (2003) mostra uma maior incidência de ITU em homens com mais de 50 anos de idade, podendo estar relacionado com outras patologias como doenças da próstata. Provavelmente relacionado à atividade bactericida do fluido prostático (ARIATHIANTO, 2011).

Os indivíduos hospitalizados são um grupo bastante vulnerável às ITUs, devido a sua condição debilitada, associada ao uso de cateteres (FOXMAN, 2002).

Já os idosos de ambos os sexos podem ser acometidos por essas infecções devido a uma série de fatores como: higiene precária, alterações anatômicas do próprio trato urinário, presença de cálculos renais, diabetes, Alzheimer, doença de Parkinson, entre outros (ARIATHIANTO, 2011).

A etiologia das ITUs difere no ambiente hospitalar e na comunidade. Em ITUs comunitárias *Escherichia coli* é o agente etiológico em cerca de 80% dos casos, seguida de *Staphilococcus saprophyticus*, espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Proteus* (RONALD, 2003). No ambiente hospitalar *E. coli* aparece em 50% dos casos, e além das espécies citadas anteriormente, são associados a ITU nasocomiais *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Serratia* e *Citrobacter* (GRIEBLING, 2007).

A terapia antimicrobiana continua a ser a base do tratamento para pacientes com ITUs. O antibiograma é utilizado para orientar a seleção da droga de escolha. No entanto, a maioria dos pacientes sintomáticos exigem o início do tratamento antes da identificação do organismo e sua suscetibilidade. Nestes casos a terapia inicial é habitualmente empírica, com as modificações subsequentes feitas com base na cultura de urina (GRIEBLING, 2007).

Quinolonas e fluorquinolonas são antimicrobianos amplamente usados no tratamento das ITUs (STAMM & NORRBY, 2001; VAN BAMBEKE et al., 2005) e que têm como alvo duas enzimas tetraméricas, com papel crucial na replicação e transcrição do DNA bacteriano, a DNA Girase (Topoisomerase II), e a Topoisomerase IV. A DNA Girase é formada por duas subunidades GyrA e duas GyrB, produtos dos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente, ela é responsável pelo superenovelamento negativo da dupla fita de DNA, necessário para a compactação do cromossomo bacteriano. A Topoisomerase IV é composta de duas subunidades ParC e duas ParE, codificadas a partir dos genes *parC* e *parE*. O principal papel da Topoisomerase IV é a decatenação (separação) das moléculas filhas de DNA, durante a replicação. A inibição dessas enzimas interfere na síntese de ácidos nucleicos resultando em morte da célula (COZZARELLI, 1980; DRALICA & ZHAO, 1997).

A resistência bacteriana contra quinolonas se resume a dois mecanismos principais: alterações nos alvos das quinolonas devido a mutações que ocorrem nas topoisomerases e diminuição do acúmulo da droga no interior da bactéria. Estes mecanismos podem ter origem cromossomal ou plasmidial (RUIZ, 2003). A ocorrência de mutações nos genes que codificam essas enzimas pode levar a

alterações estruturais que interferem na interação droga-enzima-DNA. Em Gram-negativos as mutações que conferem resistência são observadas mais frequentemente em *gyrA* e *gyrB*, e em Gram-positivos em *parC* e *parE*. Em *E. coli* mutações também ocorrem na Topoisomerase IV, pois essa enzima é o alvo secundário das quinolonas em Gram-negativos (BLANCHE, 1996). A expressão ou superexpressão de transportadores de membrana promovem o fluxo da droga para fora da célula. Ainda, alteração na capacidade das drogas penetrarem na célula bacteriana está associada a uma redução no número de proteínas porinas que permitem a entrada das fluorquinolonas na bactéria (HOOPER, 2001).

As mutações que ocorrem em *gyrA* relacionadas com resistência são observadas entre os códons 67 e 106 do gene, chamada de região determinante de resistência a quinolonas (QRDR). Esta região se encontra próximo a porção N-terminal da subunidade *gyrA* e perto do aminoácido Tyr122, que é o local de ligação do DNA com a enzima (YOSHIDA et al., 1990). A Topoisomerase IV de *E. coli* é também inibida pelas quinolonas, porém, com concentração abaixo das que inibem a DNA Girase. A resistência mediada por mutação também tem sido relatada em regiões conservadas de *parC* e *parE*, homólogas as de *gyrA* e *gyrB* respectivamente. Em ambos os casos, as mutações em *parC* e *parE* contribuem para aumentar a resistência em cepas que apresentam mutação em *gyrA*. Mutações em *parC* que ocorrem em *gyrA* selvagem não conferem a estas cepas resistência (HOOPER, 1998). Em *E. coli*, e entre outros micro-organismos, as mutações em *parC* mais comuns ocorrem nos aminoácidos Gly-78, Ser-80 e Glu-84 que são análogos aos códons Gly-81, Ser-83 e Asp-87 de *gyrA* (EVERETT, 1996; RUIZ, 2003).

O primeiro relato de resistência mediada por plasmídeo (PMQR) foi observado em 1994 quando Martinez-Martinez e colaboradores estudando um plasmídeo (pMG252) portador de multirresistência a  $\beta$ -lactâmicos, inesperadamente notaram que quando este era transferido a *E. coli*, em meio seletivo contendo uma quinolona, conferia a bactéria um aumento na concentração inibitória mínima (CIM) de 8 a 64 vezes. A designação *qnr* foi proposta para os genes envolvidos nesse mecanismo de resistência plasmidial (MARTINEZ-MARTINEZ, 1998). O produto do gene *qnr* é uma proteína com 218 aminoácidos pertencente a uma família de pentapeptídeos repetidos (PRP), que protege a DNA Girase da inibição pelas quinolonas (TRAN & JACOBY, 2002). Desde a descoberta do primeiro gene *qnr*

chamado *qnrA*, vários outros alelos foram também descritos, *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, and *qnrVC* (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Em 2006, Robicsek e colaboradores relataram uma variante da enzima aminoglicosídio acetiltransferase, codificada pelo gene *aac(6')-Ib-cr* que estava envolvida com o aumento da CIM de ciprofloxacina e norfloxacina em amostras provenientes da China. Os estudos revelaram que ela é capaz de promover a acetilação do radical amino piperazinil, presente nestas fluorquinolonas, culminando na perda de função dos fármacos (ROBICSEK et al., 2006). O aumento da CIM conferido pela *aac(6')-Ib-cr* é menor que aquele gerado pelas proteínas Qnrs, porém tem sido reportado que o gene em questão tem aparecido em associação com outros genes plasmidiais de resistência a quinolonas, bem como com  $\beta$ -lactamases em especial em *E. coli* (SHIN et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

A resistência dos patógenos as drogas antimicrobianas é um problema médico sério, devido ao rápido surgimento e disseminação de cepas mutantes que são insuscetíveis ao tratamento médico. Nas últimas três décadas, tem havido uma série de relatos na literatura sobre o uso inadequado de antimicrobianos e da propagação de resistência bacteriana entre os micro-organismos causadores de infecções do trato urinário (MANIKANDAN et al., 2011).

O estudo dos mecanismos de resistência existentes é de extrema importância e se faz necessário, a fim de se avaliar o quanto o processo de evolução destes mecanismos influencia no uso das quinolonas e das fluorquinolonas. Ainda, este tipo de trabalho auxilia a comunidade médica da prescrição de antibióticos em uma região específica. Além disso, é possível avaliar a capacidade de disseminação da resistência mediada por plasmídeos entre as linhagens bacterianas, podendo assim, contribuir para o surgimento de cepas multirresistentes. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar molecularmente os padrões de resistência a quinolonas e fluorquinolonas em linhagens de *E. coli* uropatogênicas de amostras de urina de pacientes com suspeita de infecção urinária, coletadas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Curitiba.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Meios de Cultura, Reagentes e Equipamentos Utilizados*

Os meios de cultura Ágar MaConkey, Ágar Mueller Hinton e Base de Ágar Sangue, foram obtidos da BD<sup>®</sup> ( Sparks, MD, EUA). O Ágar Triptona de Soja (TSA) e Caldo BHI foram obtidos da Himedia<sup>®</sup> (Mumbai, Índia). Todos preparados seguindo as especificações do fabricante. Além destes, foi usado o Kit para identificação de Enterobactérias e os discos de antimicrobianos da Newprov (Pinhais, PR, Brasil).

Os sais utilizados foram: Cloreto de Sódio da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), Tris base da Amresco (Solon, Ohio, EUA), EDTA da Biosolve (Valkenward, Holanda), Acetato de Amônio e Cloreto de Magnésio da USB (Cleveland, Ohio, EUA).

Os demais reagentes foram: Glicerol da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), Ácido Acético glacial e Ácido Clorídrico P.A. da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), Etanol da Panreac (Barcelona, Espanha), Brometo de Etídeo da Invitrogen (Carlsbad, California, EUA).

Os reagentes e enzimas de uso para biologia molecular foram: dNTP e Taq DNA polimerase da Invitrogen (Carlsbad, California, EUA), os oligonucleotídeos iniciadores da IDT (Coralville, Iowa, EUA), Agarose da Conda (Madrid, Espanha), Exonucleasel da Biolabs (Ipswich, New England), Fosfatase Alcalina da USB (Cleveland, Ohio, EUA) e BigDye da Applied Biosystems (Carlsbad, California, EUA).

Os equipamentos utilizados foram Estufa Bacteriológica e Balança Analítica Q500L 210C da Quimis (Diadema, SP, Brasil), Balança semi-analítica BL 3200H da Shimadzu (Kyoto, Japan), Cabine de Segurança Biológica Classe II da Veco, (Campinas, SP, Brasil), Centrífuga MCD2000 da HT (Shangai, China), Termociclador Mastercycler Gradiente da Eppendorf (Hamburg, Alemanha), Transiluminador M20 da UVP (Upland, CA, EUA), Agitador da Arthur H. Thomas (Philadelphia, Pennsylvania, EUA), Sequenciador 3500xL da Applied Biosystems (Carlsbad, California, USA).

### *Material Biológico*

Foram analisadas 55 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina de pacientes hospitalizados e da comunidade com suspeita de infecção urinária. Tal material foi doado por um laboratório de análises clínicas da cidade de Curitiba (LANAC), coletadas entre os meses de Junho e Outubro de 2011. As amostras foram recebidas do laboratório em placas de ágar CLED.

### *Armazenamento das Amostras e Identificação*

As cepas isoladas foram identificadas e testadas quanto à suscetibilidade a vários antimicrobianos no laboratório de origem. Para a realização do presente estudo, as amostras foram novamente identificadas para a certificação da espécie e determinação do biótipo. Para isso foram semeadas em Ágar MacConkey pelo método de esgotamento da alça e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas, a fim de se avaliar a pureza das amostras e eliminação de uma possível microbiota de acompanhamento.

As colônias isoladas em Ágar MacConkey foram submetidas ao teste de identificação, utilizando provas bioquímicas convencionais através do Kit para Enterobacterias (Newprov). Tal método testa a capacidade da bactéria de metabolizar vários tipos de substratos diferentes e desta forma, através de uma tabela fornecida pela própria Newprov, identificar a cepa ao nível de espécie. Em seguida, as cepas foram repicadas em meio TSA ou Base de Ágar Sangue e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C. Após o crescimento uma alçada da massa bacteriana foi dissolvida em caldo BHI acrescido de glicerol a 15% e armazenada a -20°C. Somente as amostras confirmadas como *E. coli* pela série bioquímica e livres de contaminantes foram incluídas no presente estudo.

### *Teste de suscetibilidade aos Antimicrobianos*

Para a realização do Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, as cepas foram descongeladas e repicadas em meio TSA ou Base de Ágar Sangue (BD) e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C. O teste foi realizado segundo o método de Kirby-Bauer, padronizado pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2005).

Os antimicrobianos selecionados da classe das quinolonas foram o Ácido Nalidíxico (Nal), Ciprofloxacina (Cip), Norfloxacin (Nor) e Ofloxacina (Ofx).

Para a triagem das enzimas ESBL's foram testados os antimicrobianos beta-lactâmicos Amoxicilina com Ácido Clavulânico (Amc), Cefotaxima (Ctx), Ceftazidima (Caz) e Aztreonam (Atm) pelo método de disco aproximação (JARLIER et al., 1988).

#### *Amplificação dos Genes pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

A detecção dos genes relacionados à resistência a quinolonas foi realizada amplificando-se parte destes genes pelo método de PCR Multiplex, utilizando-se como molde o DNA de uma colônia bacteriana isolada em placa.

Para isso, cada amostra foi repicada em meio Ágar MacConkey pelo método de esgotamento da alça e incubada a 37°C por 18 a 24h. Certa quantidade da massa bacteriana foi retirada, a partir de uma colônia, com auxílio de um palito de dente estéril e colocada em um microtubo de 0,2mL, acrescido de 15µL de água MiliQ autoclavada. Esse sistema foi submetido a 95°C por 15min, para permitir a lise do revestimento celular e a liberação do material genético bacteriano. Em seguida, foi adicionada a mistura de reação para um volume final de 30µL, composta por: água MiliQ autoclavada, solução tamponante de reação (10X) na concentração final de 1X, Cloreto de Magnésio (50mM), concentração final 2,5mM, *Taq* DNA polimerase na concentração de 0,025U/µL, os quatro nucleotídeos dNTP (Invitrogen) (10mM), concentração final 0,2mM e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (IDT) a 0,2µM cada, com exceção do *primer* ParC a 0,4µM.

Os *primers* foram selecionados a partir da literatura consultada. O par de GyrA e o de ParC anelam no gene flanqueando e amplificando a região QRDR, onde se encontram as principais mutações responsáveis pela resistência a nível cromossomal (YOSHIDA et al., 1990). Já os pares Qnr's e aac(6')-ib-cr são responsáveis pela amplificação de genes presentes em plasmídeos relacionados com o mecanismo de resistência (MARTINEZ-MARTINEZ, 1998; ROBICSEK et al., 2006). As condições para PCR foram: um ciclo de 95°C por 2 min e 35 ciclos de 95°C por 30s, 55,4°C por 60s e 72°C por 60s. As sequências dos *primers* estão relacionadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Sequência dos pares de *primers* utilizados para o PCR Multiplex. O tamanho em pb (pares de bases) do *amplicon* (fragmento do gene amplificado) gerado por cada par. Referência do trabalho de onde cada par foi selecionado. (F) = forward, (R) = reverse.

| Primer           | Sequência                      | pb  | Referência                 |
|------------------|--------------------------------|-----|----------------------------|
| GyrA F           | AAA TCT GCC CGT GTC GTT GGT    | 344 | Rodrigues & Martinez, 2006 |
| GyrA R           | GCC ATA CCT ACG GCG ATA CC     |     |                            |
| ParC F           | GTA TGC GAT GTC TGA ACT        | 230 | Cattoir, 2006              |
| ParC R           | TTC GGT GTA ACG CAT TGC        |     |                            |
| aac (6')-Ib-cr F | TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA | 482 | Hye, 2006                  |
| aac (6')-Ib-cr R | CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT     |     |                            |
| QnrS F           | ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA     | 417 | Robicsek, 2006             |
| QnrS R           | TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC     |     |                            |
| QnrB F           | ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA     | 600 | Rios, 2007                 |
| QnrB R           | GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT     |     |                            |
| QnrA F           | AAG GAA GCC GTA TGG ATA TT     | 670 | Jiang, 2008                |
| QnrA R           | AGC TAA TCC GGC AGC ACT AT     |     |                            |

### *Eletroforese em Gel de Agarose*

Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese, aplicando-se 10µL do produto de PCR em gel de agarose a 2%, com 60 volts de ddp, durante 2 horas de corrida em TAE 1x (Tris 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM). A visualização dos amplicons foi realizada sob luz ultravioleta (254nm), após tratamento do gel com brometo de etídio 0,5µg/mL durante 30 minutos sob agitação, seguidos de 5 minutos de tratamento com água para remoção do excesso de brometo de etídio.

### *Purificação Enzimática dos Produtos da PCR*

Após a certificação da amplificação (resultado positivo na eletroforese), os 20µL restantes do produto da PCR foram submetidos a tratamento com 0,5 µL de Exonuclease I (Biolabs) a 20U/ µL e 1,0 µL de Fosfatase Alcalina (SAP) (USB) a 1U/µL por 90min a 37°C. Tais enzimas purificam o produto da PCR por removerem respectivamente os oligonucleotídeos e os dNTP's que tenham sobrado na reação.

As enzimas são então inativadas encubando-se o sistema a 80°C por 30 min. As amostras purificadas foram conservadas a -20°C.

### *Sequenciamento*

Os genes isolados e amplificados foram sequenciados, utilizando-se o Kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing. Após o tratamento com Exonuclease I e SAP, as amostras foram submetidas a uma nova PCR e esta destinada ao sequenciamento. Em um volume final de 10µL de reação, foi adicionado solução tamponante [Tris-HCL (pH 9) 80mM, Cloreto de Magnésio 2 mM] (3µL), BigDye (1µL), Primer (0,5µL a 10pmol/µL), DNA purificado (5µL) proveniente da PCR multiplex tratada e 0,5µL de água MiliQ autoclavada. Em seguida, esse sistema foi submetido a nova PCR nas seguintes condições: um ciclo de 96°C por 2 min e 35 ciclos de 96°C por 45s, 55,4°C por 30s e 60°C por 4min.

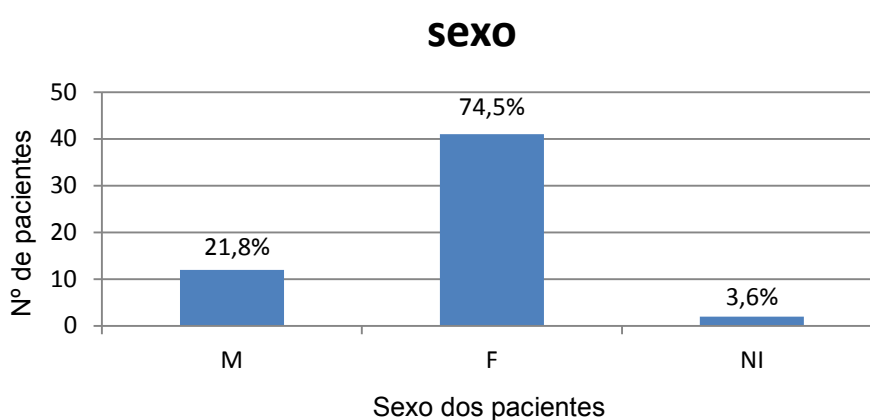
Na sequência, foi realizada a precipitação do produto da PCR, adicionando aos 10 µL do amplificado para sequenciamento: 2µL de acetato de amônio 7,5M, 60µL de etanol absoluto e 10µL de água MiliQ autoclavada, seguido de centrifugação a 14000 rpm, por 45 min. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionado 150µL de etanol 70% e centrifugado na mesma rotação do passo anterior por 10min. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco por uma hora ao abrigo da luz e armazenado a -20°C.

As amostras assim preparadas foram então enviadas para a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e para a Universidade Federal do Paraná e através do sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems) foram obtidas as sequências dos genes isolados. As sequências obtidas foram analisadas através do programa Bioedit e comparadas àquelas depositadas no *GenBank* ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)).

## RESULTADOS

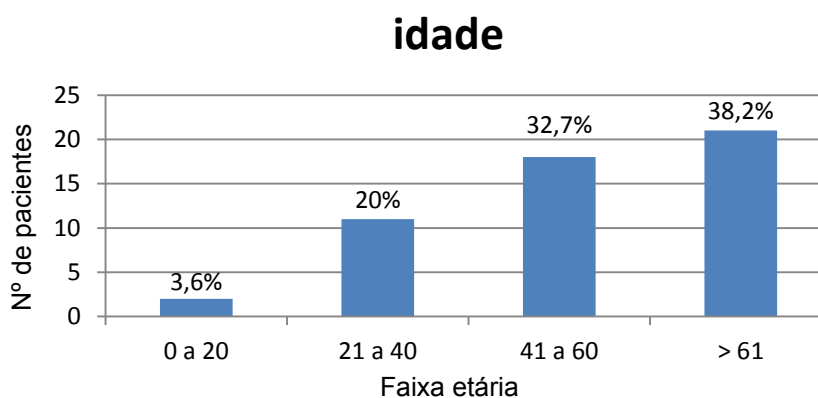
### *Perfil das Amostras Quanto a Idade e Sexo dos Pacientes*

Das 55 amostras de *E.coli* provenientes de pacientes com suspeita clínica de infecção urinária, 42 eram de origem comunitária, 11 hospitalar e duas não identificadas. Em relação ao sexo, 12 eram de pacientes masculinos (21,8%), 41 de femininos (74,5%) e duas não identificadas (3,6%), como mostrado no gráfico da figura 11.



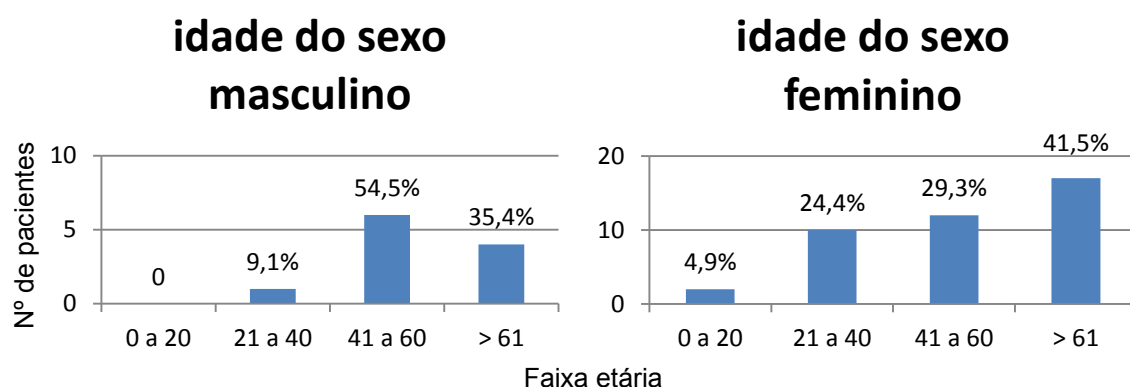
**Figura 11:** Perfil das 55 amostras quanto ao sexo dos pacientes. (M) Masculino, (F) feminino e (NI) não informado

Quanto à idade, sem levar em consideração o sexo, as amostras apresentaram o seguinte perfil: de 0 a 20 anos, duas amostras, entre 21 a 40 anos, 11 amostras, de 41 a 60 anos, 18 amostras e pacientes com idade superior a 60 anos 21 amostras, como mostrado no gráfico da figura 12.



**Figura 12:** Perfil das amostras, em relação à idade dos pacientes, independente do gênero.

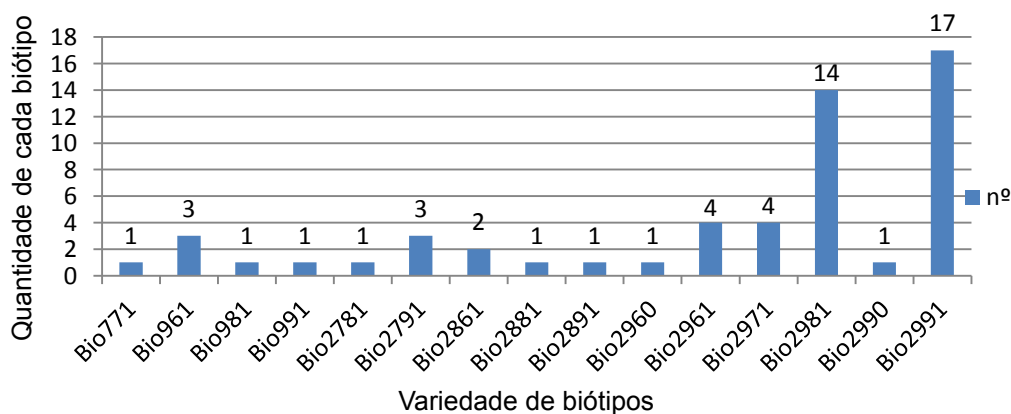
De outra forma pode-se analisar a frequência das idades separando-se as amostras pelo sexo e obtendo o resultado que se segue. Para o sexo feminino observou-se duas amostras de 0 a 2 anos, 10 entre 21 e 40, 12 entre 41 e 60 e 17 acima de 60 anos. Para os homens pode-se observar uma amostra entre 21 a 40 anos, 6 entre 41 a 60 e 4 com idade igual ou superior a 61 anos. Nos homens não foram observados pacientes com idade inferior a 20 anos. Obs. Em três amostras a idade do paciente não era informada no laudo. As porcentagens de tal análise estão representadas nos gráficos da figura 13.



**Figura 13:** Perfil das amostras separadas por idade e sexo dos pacientes.

#### Identificação das Cepas Quanto ao Biótipo

Após a realização dos testes bioquímicos para a identificação dos micro-organismos existentes nas amostras, pode-se levantar a diversidade de biótipos de *E. coli* existentes, a qual é demonstrada no gráfico da figura 14. Os biótipos mais frequentes foram: 2991 (n=17) e 2981 (n=14) e todas as amostras que apresentaram esse biótipo se mostraram resistentes a todas as quinolonas testadas.



**Figura 14:** Frequência dos biótipos encontrados através da série bioquímica.

### Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

Com a realização do Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, pode-se avaliar qualitativamente o perfil das amostras (sensível, resistente ou intermediário determinado pelo CLSI) aos seguintes antimicrobianos: Ácido Nalidíxico (Nal), Ciprofloxacina (Cip), Norfloxacina (Nor) e Ofloxacina (Ofx), e ainda aos  $\beta$ -lactâmicos amoxicilina + ác. Clavulânico (Amc), ceftazidima (Caz), cefotaxima (Ctx) e aztreonam (Atm) conforme a tabela 2.

Das 55 amostras estudadas 38 (69,1%) apresentaram resistência a todas as quinolonas testadas, 2 (3,6%) foram resistentes as quinolonas e aos  $\beta$ -lactâmicos, 2 (3,6%) foram resistentes as quinolonas e ESBL. Ainda, uma (1,8%) amostra foi ESBL e sensível as quinolonas, 6 (10,9%) apresentaram resistência intermediária a uma ou mais quinolonas, 4 (7,3%) foram resistentes a quinolonas e intermediária aos  $\beta$ -lactâmicos. Apenas uma amostra apresentou ESBL e sensibilidade as quinolonas e 2 (3,6%) se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos estudados.

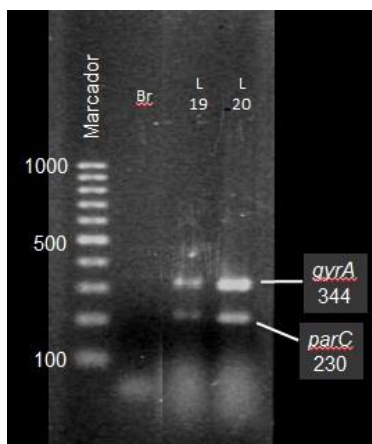
**Tabela 2:** Perfil de resistência aos antimicrobianos testados, encontrado nas amostras analisadas.

| Padrão Resistência                                              | Nº amostras | %    |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|------|
| Resistentes a todas as quinolonas                               | 38          | 69,1 |
| Intermediárias a uma ou mais quinolonas                         | 6           | 10,9 |
| Resistentes a quinolonas e $\beta$ -lactâmicos                  | 2           | 3,6  |
| Resistentes a quinolonas e Intermediárias a $\beta$ -lactâmicos | 4           | 7,3  |
| ESBL e Resistentes a Quinolonas                                 | 2           | 3,6  |
| ESBL                                                            | 1           | 1,8  |
| Sensíveis a todos os antimicrobianos testados                   | 2           | 3,6  |

### Amplificação dos genes de interesse

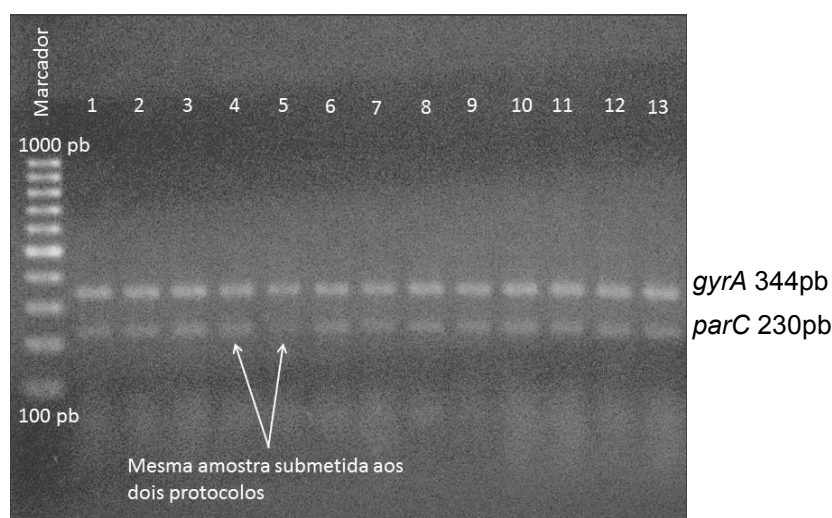
Diante do envolvimento dos genes *gyrA* e *parC* na resistência as quinolonas, *primers* descritos na literatura, que anelam em regiões conservadas desses genes, foram utilizados para amplificá-los pelo método de PCR Multiplex. Vários ajustes nas condições da PCR foram necessários para que os resultados fossem positivos,

principalmente para a amplificação do gene *parC*. A figura 15 mostra os resultados positivos para os genes *gyrA* e *parC* em duas das amostras testadas.



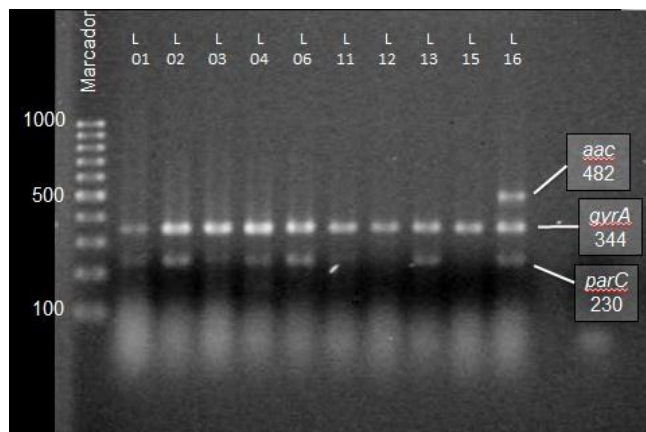
**Figura 15:** Genes *gyrA* e *parC* amplificados em duas das amostras testadas. Lane um: marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Lane dois branco. Gel de agarose a 2%.

Inicialmente a PCR foi realizada misturando-se todos os reagentes (*master mix*) com uma pequena quantidade da massa bacteriana de uma colônia isolada e incubando a 95°C por 5min, seguidos de 35 ciclos de reação. Nestas condições, algumas amostras não amplificaram nenhum dos genes ou apenas o gene *gyrA* foi amplificado. A prévia incubação a 95 °C por 15 min da mistura da massa bacteriana da colônia com a água do sistema antes da adição do *master mix* otimizou as amplificações. Foi realizado um teste comparando os dois protocolos e o resultado pode ser observado na figura 16.



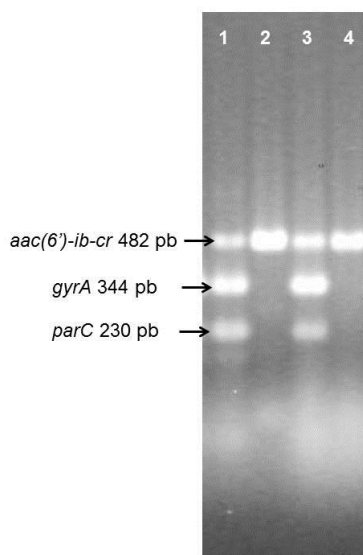
**Figura 16:** Teste comparando os dois protocolos de PCR multiplex com *template* direto da colônia bacteriana. As lanes 4 e 5 mostram o resultado de amplificação das mesma amostra submetida aos dois protocolos descritos no texto. Na lane 4 observamos a amplificação de *parC* e na lane 5 o gene quase não aparece. Lane um: marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb). Gel de agarose a 2%.

Das 55 amostras, duas delas (3,6%) apresentaram resultado positivo para o gene *aac (6')-Ib-cr*, (figura 17).



**Figura 17:** Resultado positivo para amplificação do gene *aac (6')-Ib-cr* em uma das duas amostras onde foi encontrado (L16). Lane um: marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Gel de agarose a 2%.

Devido à utilização de PCR multiplex, onde foram colocados seis pares de *primers* no mesmo sistema, alguns dos *amplicons* gerados por esses *primers* possuem tamanhos parecidos, como os dos *primers* QnrS (417pb) e *aac(6')-ib-cr* (482pb), nos resultados positivos para esse último, uma PCR contendo somente esse par de *primers* foi realizada como prova confirmatória (figura 18).



**Figura 18:** Prova confirmando a amplificação do gene *aac(6')-ib-cr*. As lanes um e três representam a PCR multiplex das amostras L16 e L52 (positivas para o gene), as lanes dois e quatro representam as mesmas amostras porém utilizando apenas o par de *primers* *aac(6')-ib-cr* F (forward) e R (reverse). Gel de agarose a 2%.

Nenhuma das cepas testadas apresentou resultado positivo para os genes *qnr's* e nenhuma das cepas estudadas que foram positivas para ESBL estava associada com a presença do gene *aac (6')-Ib-cr*.

Sequenciamento dos Genes *gyrA* e *parC*

Parte das amostras estudadas (uma sensível e três resistentes) tiveram os *amplicons* dos genes *gyrA* e *parC* sequenciados na UFPR. A escolha dessas amostras foi feita para se poder comparar uma sensível com uma resistente a quinolonas e outra resistente a quinolonas e produtora de ESBL. Comparando a região do gene *gyrA* amplificada nas amostras com o da cepa selvagem, *E. coli* K12 MG1655, tanto na amostra sensível como nas resistentes, foram observadas 4 mutações silenciosas: nos códons 85 (GTC na K12 para GTT, ambos codificando para o aminoácido Val), 91 (CGC para CGT que codificam para Arg), 100 (TAT para TAC que codificam para Tyr) e no códon 111 (TCT para TCC que codificam para Ser). Analisando somente as cepas resistentes, nas três amostras foram observadas quatro mutações (não observadas na cepa sensível), duas silenciosas, uma no códon 156 (CCG para CCC ambos para Pro) e no códon 160 (CCA para CCG ambos para Pro) e outras duas, com substituição de pares de bases, uma no códon 83 que é formado por TCG (Ser), mudando para TTG (Leu) e outra no códon 87 com a mudança de GAC (Asp) para AAC (Asn). O resultado parcial do alinhamento é mostrado na figura 19.

| Nucleotídeo     |     |     | 248 |     |     |     | 259 |     |     |  |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| <i>gyrA</i> K12 | GGT | GAC | TCG | GCG | GTC | TAT | GAC | ACG | ATC |  |
| L04             | --- | --- | --- | --- | T   | --- | --- | --- | --- |  |
| L02             | --- | --- | T   | --- | T   | --- | A   | --- | --- |  |
| L06             | --- | --- | T   | --- | T   | --- | A   | --- | --- |  |
| L09             | --- | --- | T   | --- | T   | --- | A   | --- | --- |  |
| Códon           |     |     | 83  |     |     |     | 87  |     |     |  |
| Aminoácidos     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <i>gyrA</i> K12 | Gly | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Asp | Thr | Ile |  |
| L04             | Gly | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Asp | Thr | Ile |  |
| L02             | Gly | Asp | Leu | Ala | Val | Tyr | Asn | Thr | Ile |  |
| L06             | Gly | Asp | Leu | Ala | Val | Tyr | Asn | Thr | Ile |  |
| L09             | Gly | Asp | Leu | Ala | Val | Tyr | Asn | Thr | Ile |  |

Os traços \_  
representam  
nucleotídeos  
iguais à  
cepa K12

**Figura 19:** Parte do alinhamento entre o gene completo *gyrA* de *E. coli* K12, com as regiões amplificadas das amostras analisadas, mostrando as mutações relacionadas a resistência. Posições 248 e 259, códons 83 e 87 respectivamente. L04 amostra sensível a todos os antimicrobianos testados, L02 – Nal (R), Cip (R), Nor (R), Ofx (R), L06 – Amc (R), Atm (I), Ctx (I), Nal (R), Cip (R), Nor

(R), Ofx (R) e produtora de ESBL e L09 – Nal (R), Cip (R), Nor (R), Ofx (R). ■ Mutação com troca de aminoácido, ■ mutação silenciosa. (R) resistente (I) intermediário. Amc (amoxicilina + ácido clavulânico), Atm (aztreonam), Ctx (cefotaxima), Nal (ácido nalidíxico), Cip (ciprofloxacina), Nor (norfloxacina) e Ofx (ofloxacina). Gly (glicina) Ser (serina), Asp (ácido aspártico), Ala (alanina), Val (valina), Leu (leucina), Tyr (tirosina), Asn (asparagina), Thr (treonina) e Ile (isoleucina).

Analisando a região do gene *parC* amplificada nas amostras com o gene da cepa selvagem utilizada como modelo, *E. coli* K12, observou-se duas mutações sem troca de aminoácido na cepa sensível: uma no códon 80, (AGC para AGT ambos para Ser) e no códon 91 (CAA para CAG ambos para Gln). Nas cepas resistentes foi encontrada a mesma mutação no códon 91 e uma mutação relacionada (pela literatura consultada) com a resistência as quinolonas. Esta mutação foi observada também no códon 80, porém, em posição diferente da encontrada na amostra sensível (AGC para ATC) neste caso trocando o aminoácido de Ser para Ile (figura 20). Vários trabalhos publicados relatam mutação no códon 84 de *parC*, porém, nas amostras analisadas nenhuma apresentou mutação neste aminoácido. A tabela 3 compara o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, com as mutações nos genes cromossomais, importantes no mecanismo de resistência.

|                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Nucleotídeo     | 239 |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <i>parC</i> K12 | GGC | GAT | AGC | GCC | TGT | TAT | GAA | GCG | ATG |  |
| L04             | --- | --- | T   | --- | --- | --- | --- | --- | --- |  |
| L02             | --- | --- | T   | --- | --- | --- | --- | --- | --- |  |
| L06             | --- | --- | T   | --- | --- | --- | --- | --- | --- |  |
| L09             | --- | --- | T   | --- | --- | --- | --- | --- | --- |  |
| Códon           | 80  |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Aminoácidos     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <i>parC</i> K12 | Gly | Asp | Ser | Ala | Cys | Tyr | Glu | Ala | Met |  |
| L04             | Gly | Asp | Ser | Ala | Cys | Tyr | Glu | Ala | Met |  |
| L02             | Gly | Asp | Ile | Ala | Cys | Tyr | Glu | Ala | Met |  |
| L06             | Gly | Asp | Ile | Ala | Cys | Tyr | Glu | Ala | Met |  |
| L09             | Gly | Asp | Ile | Ala | Cys | Tyr | Glu | Ala | Met |  |

**Figura 20:** Parte do alinhamento entre o gene completo *parC* de *E. coli* K12, com as regiões amplificadas das amostras analisadas, mostrando a mutação silenciosa em L04 (posição 240, códon 80) e a relacionada a resistência em L02, L06 e L09 (posição 239 no códon 80). ■ Mutação com troca de aminoácido, ■ mutação silenciosa. Cys (cisteína), Glu (ácido glutâmico) e Met (metionina).

**Tabela 3:** Comparação entre o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados e as mutações observadas nos genes *gyrA* e *parC*. As letras S, I e R representam: sensível, intermediária e resistente, respectivamente. Amc (amoxicilina + ácido clavulânico), Atm (aztreonam), Ctx (cefotaxima), Caz (ceftazidima), Nal (ácido nalidíxico), Cip (ciprofloxacina), Nor (norfloxacina) e Ofx (ofloxacina). Ser (serina), Asp (ácido aspártico), Leu (leucina), Asn (asparagina), Ile (isoleucina) e Glu (ácido glutâmico).

| Amostra    | Perfil de Resistencia |     |     |     |     |     |     |     | Aminoácido codificado |     |                    |     |
|------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------|-----|--------------------|-----|
|            | Amc                   | Atm | Ctx | Caz | Nal | Cip | Nor | Ofx | Códons <i>gyrA</i>    |     | Códons <i>parC</i> |     |
|            |                       |     |     |     |     |     |     |     | 83                    | 87  | 80                 | 84  |
| <b>L04</b> | S                     | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | Ser                   | Asp | Ser                | Glu |
| <b>L02</b> | S                     | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | Leu                   | Asn | Ile                | Glu |
| <b>L06</b> | R                     | I   | I   | S   | R   | R   | R   | R   | Leu                   | Asn | Ile                | Glu |
| <b>L09</b> | S                     | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | Leu                   | Asn | Ile                | Glu |

## DISCUSSÃO

### *Dados Epidemiológicos e Biótipos*

Analisando os dados epidemiológicos, vemos uma maior incidência de ITU em mulheres do que em homens (figura 11) e são coerentes com os citados na literatura (GRIEBLING, 2007). O aumento da frequência de ITU no sexo masculino também pode ser explicado pela alta incidência de outras patologias como doenças da próstata (DIAS NETO, 2003). Porém, os dados da figura 13 mostram uma diminuição da porcentagem dos pacientes com 61 anos ou mais. Teoricamente esse grupo deveria ser o maior. Esta divergência pode estar relacionada a uma amostragem não representativa de todas as idades no sexo masculino, devido à dificuldade de muitos idosos em realizar ou ter acesso aos exames de confirmação do diagnóstico.

Os dados da figura 13 também revelam que no sexo feminino ocorre uma distribuição mais uniforme entre 21 a 40 anos e uma maior porcentagem com idades acima de 61. Segundo Lopes e Tavares (2005), nas mulheres, o maior índice ocorre durante a vida sexual ativa e em idades avançadas devido a episódios prévios de cistites, higiene pessoal, diabetes e obesidade. Outro fator determinante no grupo com idade superiores a 61 anos é a condição da microbiota endógena feminina alterada devido à menopausa (GRIEBLING, 2007). Vários estudos apontam que o

homem vai menos ao médico do que as mulheres e isso pode explicar a diferença encontrada entre os sexos com idades acima de 61 anos (GOMES et al., 2007).

Em relação aos biótipos, nota-se uma grande heterogeneidade de fenótipos, pois cada número representa uma diferença metabólica resultante de uma diversidade enzimática observada frente aos diferentes substratos que cada amostra é inoculada. Por exemplo, os biótipos mais frequentes 2991 (30,9%) e 2981 (25,5%) ambos são capazes de fermentar os açúcares glicose, lactose e ramnose, produzir CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> a partir do ácido fórmico, descarboxilar os aminoácidos lisina e ornitina produzindo aminas e produzir indol a partir do triptofano (WINN JR et al., 2008). Porém, apesar de serem da mesma espécie, diferem pela presença de flagelo no biótipo 2991 e ausência no 2981. Isto é detectado pela incapacidade deste último em se difundir em meio de cultura semissólido. Pensando em fator de virulência, poderíamos imaginar que bactérias flageladas teriam mais facilidade de ascender às vias urinárias superiores do que aquelas sem flagelo.

Cada biótipo de *E. coli* pode estar relacionado com fatores de virulência como verificado no trabalho de Lemos e colaboradores (2011), onde a capacidade de metabolizar cinco carboidratos diferentes foi comparada com a presença de determinados fatores de virulência. Uma análise estatística mostrou que um determinado biótipo era mais virulento. Determinar o biótipo é menos dispendioso e mais aplicável na rotina laboratorial.

#### *Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos*

Os dados mostram alta frequência da resistência às quinolonas testadas, isso pode refletir o uso intenso desses fármacos, associados com os vários mecanismos de resistência já descritos. Esses números são mais altos do que os encontrados na literatura (DAZA, 2001; HRYNIEWICZA, 2001; DIAS NETO et. al., 2003; DAS et al., 2009). A baixa porcentagem de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos sugere ser esses antibióticos a segunda escolha em caso de falha no tratamento com quinolonas as ITUs nesta região. Portanto, os dados mostrados têm relevância médica, pois podem auxiliar na escolha do antimicrobiano durante a antibióticoterapia.

### *Genes Amplificados na PCR*

Um recente trabalho de Paiva e colaboradores em 2012 relata pela primeira vez no Brasil, a ocorrência do determinante *aac (6')-Ib-cr*. Nesse trabalho, tal gene foi detectado em quatro amostras de 101, isoladas de urina de mulheres com ITUs, na cidade de Belo Horizonte, MG, coletadas em 2009 (PAIVA et. al., 2012). Estes dados são coerentes com a frequência para o mesmo gene encontrados na presente pesquisa. Em um estudo de Pitout e colaboradores (2008) foram analisadas amostras isoladas de urina de pacientes com ITUs, em dois tempos diferentes de 2004 e 2007, na cidade de Calgary no Canadá. Em 2004, a frequência do gene *aac (6')-Ib-cr* foi de 4% nas amostras de *E. coli* analisadas e em 2007 subiu para 13%. É interessante notar que os valores da frequência de *aac (6')-Ib-cr*, no trabalho de Pitout em 2004, estão próximos dos encontrados por Paiva em 2012 e os do encontrados no presente estudo. Análises posteriores deverão ser feitas na mesma região de onde procedem as amostras aqui utilizadas, para avaliar a possibilidade de aumento na frequência desse gene na população bacteriana contribuindo assim para uma possível emergência desse gene.

### *Mutações Observadas nos Genes *gyrA* e *parC**

Segundo Ruiz (2003), em enterobactérias que apresentam resistência a quinolonas, as mutações mais comuns ocorrem nos códon 83 e 87 de *gyrA* e 80 e 84 de *parC*. Ainda, o acúmulo de mutação nesses genes gera altos níveis de resistência. Como descrito por Yoshida e colaboradores (1990), estas mutações ocorrem dentro da região QRDR e são responsáveis pela resistência aos antimicrobianos testados. Pôde-se observar que três mutações, sendo duas em *gyrA* e uma em *parC* podem ter sido suficientes para gerar a resistência em todas as quinolonas em que estas amostras foram submetidas. Vale lembrar que o teste de disco difusão apenas qualifica as amostras como resistente, resistente intermediária ou sensível. Para avaliar o grau com que cada mutação influencia na resistência deve ser feito um método quantitativo. As duas mutações observadas em *gyrA* aqui observadas, Ser-83 para Leu e Asp-87 para Asn são amplamente reportadas na literatura (VILA et al., 1994; EVERETT, 1996).

Um trabalho de Vila e colaboradores, (1994) mostrou que em isolados

clínicos com CIM para ciprofloxacina  $\geq 1$  ug/mL, apresentavam apenas uma mutação em Ser-83. Cepas com duas mutações em *gyrA*, Ser-83 e Asp-87 apresentavam CIM  $\geq 8$  ug/mL para ciprofloxacina. Neste mesmo trabalho, através de um estudo matemático, os pesquisadores associaram a distância entre os substituintes C-7 e N-1 (mostrado na figura 3) da estrutura química da ciprofloxacina com as distâncias dos aminoácidos Ser-83 e Asp-87 na porção *gyrA* da DNA Girase. Os resultados mostraram uma compatibilidade entre as distâncias dessas regiões, sugerindo que uma mudança na estrutura da proteína por substituições nesses aminoácidos influencia na atividade do fármaco por dificultar sua ligação a enzima. As mutações sem substituição de aminoácidos em *gyrA* nos códons 85 e 91 também já foram relatadas na literatura (EVERETT, 1996).

## 5. CONCLUSÕES

1. A análise epidemiológica das amostras revelou uma maior incidência de ITUs em pacientes do sexo feminino adulto idoso.
2. Quanto às características bioquímicas de cada isolado, os biótipos mais comuns de *E. coli* segundo tabela da Newprov foram 2981 e 2991.
3. Os resultados quanto ao perfil de resistência mostram que 69,1% das amostras apresentaram resistência a todos os antimicrobianos da classe das quinolonas testados e apenas quatro (7,3%) não eram resistentes a pelo menos um desses antimicrobianos.
4. Em três amostras foi detectada a presença de ESBL, porém, nenhuma delas estava associada ao gene *aac(6')-ib-cr*. Estes resultados mostraram a alta incidência de resistência a quinolonas em amostras de urina e ainda uma baixa incidência de ESBL.
5. Quanto aos resultados moleculares observados, apenas uma parte das amostras pôde ser analisada e estas mostraram mutações acumuladas nos genes cromossomais de GyrA e ParC, responsáveis pela resistência.
6. Conforme o esperado, a amostra sensível não apresentou mutações com troca de aminoácidos na região amplificada da QRDR.
7. Não foram observados elementos móveis *qnr's*, porém um dado extremamente importante foi a presença em duas amostras do gene *aac(6')-ib-cr*.

## 6. REFERÊNCIAS

ANDRIOLE V. T. The Quinolones: Past, Present, and Future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 113–119, 2005.

ARIATHIANTO, Y. Asymptomatic bacteriúria: prevalence in the elderly population. **Australian Family Physician**, v.40, n.10, p.805-809, 2011.

ARISOY, M.; AYSEV, D.; EKIM, M.; OZEL, D.; KOSE, S. K.; OZSOY, E. D.; AKAR, N. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, p. 170-173, 2006.

BALL, P. Quinolone generations-natural history or natural selection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 17-24, 2000.

BLANCHE, F.;CAMERON, B.; BERNARD, F. X.; MATON, L.; MANSE, B.; FERRERO, L.; RATET, N.; LECOQ, C.; GONIOT, A.; BISCH, D.; CROUZET, J. Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.40, p. 2714-2720, 1996.

BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1–14, Jan. 2004.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* groups – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 6, p. 545-552, oct. 2004.

CATTOIR, V. ; LESPRIT, P. ; LASCOLS, C. ; DENAMUR, E. ; LEGRAND, P. ; SOUSSY, C. J. ;CAMBAU, E. In vivo selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p.1054–1057, 2006.

CATTOIR, V., POIREL, L., NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 52, p. 3801–3804, 2008.

CAVACO, L. M.; HASMAN, H.; XIA S.; AARESTRUP, F. M. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53 p.603–608, 2009.

CHEN, S. L.; JACKSON, S. L.; BOYKO, E. J. Diabetes Mellitus and Urinary Tract Infection: Epidemiology, Pathogenesis and Proposed Studies in Animal Models. **The Journal Of Urology**, v. 182, p.51-56, dec. 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement. **CLSI/NCCLS document M**, p. 100-115, 2005.

COZZARELLI, N. R. DNA Gyrase and the Supercoiling of DNA. **Science**, v. 207, p. 953-960, feb. 1980.

DAS, R. .; PERRELLI, E.; TOWLE, V.; NESS, P. H. V.; JUTHANI-MEHTA, M. Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Urine Samples Obtained from Nursing Home Residents. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 11, p. 1116–1119, nov. 2009.

DAZA, R.; GUTIÉRREZ, J.; PIÉDROLA, G. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, Issue 3 , p. 211-215, sep. 2001.

DIAS NETO, J. A; MAGALHÃES DA SILVA, L. D; MARTINS, A.C. P; TIRABOSCHI, R. B; DOMINGOS, A. A; SUAID, HJ; TUCCI, Jr. S; et al. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, p. 36-38, 2003.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-quinolone. **Microbiology and Molecular Reviews**, v. 61, p. 377-392, 1997.

EVERETT, M. J. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strain isolated from humans and animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 10, p. 2380-2386, 1996.

FIHN, S. D. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 259-266, 2003.

FOXMAN B, FRERICHS RR. Epidemiology of urinary tract infection: I. Diaphragm use and sexual intercourse. **The American Journal of Public Health**, v. 75, p. 1308–1313, 1985.

FOXMAN, B. Epidemiology of Urinary Tract Infections: Incidence, Morbidity, and Economic Costs. **The American Journal of Medicine**, v.113, n.1A, p. 5-13, 2002.

GRIEBLING, T L. Urinary Tract Infection in Women. **Urologic Diseases in America**, Washington, DC, chapter 18, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and

Digestive and Kidney Diseases, US Government Printing Office, NIH Publication No. 07-5512, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HANSEN, L. H.; JENSEN, L. B.; SØRENSEN, H. I.; SØRENSEN, S. J. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 145–147, 2007.

HARDY, C. D.; COZZARELLI, N. R. Alteration of *Escherichia coli* Topoisomerase IV to Novobiocin Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 941-947, 2002.

HATA, M.; SUZUKI, M.; MATSUMOTO, M.; TAKAHASHI, M.; SATO, K.; IBE, S.; SAKAE, K. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.801–803, 2005.

HIRAI, K.; AOYAMA, H.; IRIKURA, T.; IYOBE, S.; MITSUHASHI, S. Differences in Susceptibility to Quinolones of Outer Membrane Mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 535-538, Mar. 1986.

HOOPER, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug Resistance Updates**, v.2, p. 38–55, 1999.

HOOPER, D. C. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 31, Issue S2, p. 24–28, ago. 2000.

GOMES, R.; NASCIMENTO, E. F.; ARAÚJO, F. C. Por que os homens buscam menos os serviços de saúde do que as mulheres? As explicações de homens com baixa escolaridade e homens com ensino superior. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 565-574, mar. 2007.

HOOPER, D. C. Emerging mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 2, p. 337-341, mar./abr. 2001.

HOOTON, T. M. Pathogenesis of Urinary Tract Infections: an update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 1-7, 2000.

HRYNIEWICZA, K.; SZCZYPAB, K.; SULIKOWSKAB, A.; JANKOWSKIA, K.; BETLEJEWSKAB, K.; Waleria HRYNIEWICZB, W. Antibiotic susceptibility of bacterial

strains isolated from urinary tract infections in Poland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, V. 47, P. 773–780, 2001.

HU, F.; XU, X.; ZHU, D.; WANG, M. Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.29, p. 320-324, 2008.

HYE, P.C.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n.11 , p. 3953–3955, nov. 2006.

ITO, C. A. S.; GALES, A. C.; TOGNIM, M. C. B.; MUNERATO, P.; COSTA, L. M. D. Quilone-Resistant *Escherichia coli*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 12, n. 1, p. 5-9, fev. 2008.

JACOBY, G. A., WALSH, K. E.; MILLS, D. M.; WALKER, V. J.; OH, H.; ROBICSEK, A.; HOOPER, D. C. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p. 1178–1182, 2006.

JACOBY, G. A.; CATTOIR, V.; HOOPER, D.; MARTINEZ-MARTINEZ, I.; NORDMANN, P.; PASCUAL, A.; POIREL, L.; WANG, M. *qnr* gene nomenclature. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n.7, p. 2297–2299, 2008.

JARLIER, V.; NICOLAS, H.M.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broadspectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p. 867–878, 1988.

JIANG, Y. ;ZHOU, Z. H. ;QIAN, Y. ;WEI, Z. Q. ;YU, Y. S. ;HU, S. N. ;LI, L. J. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China . **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n.5, p.1003-1006, mai. 2008.

KATO, J.; NISHIMURA, Y.; IMAMURA, R.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; SUZUKI, H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. **Cell**, v. 63, p. 393–404, 1990.

KAMPRANIS, S.C.; BATES, A.D. MAXWELL, A.. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 841-849, 1999.

KIM, H. B.; WANG, M.; PARK, C. H.; KIM, E. C. *oqxAB* Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3582–3584, aug. 2009.

LEE, J. B. L. Urinary tract infection. **Medicine**, v. 35, issue 8, p. 423-428, 2007.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LEMOS, T.D. et al.. Avaliação da biotipagem na distinção de perfis de virulência de amostras de *Escherichia coli* uropatogênica isoladas no hospital universitário Antonio Pedro, Niterói, RJ. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 26, 2011, Foz do Iguaçu. Anais eletrônicos. Foz do Iguaçu, SBM, 2011. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R1360-2.html>>. Acesso em 10 dez. 2012.

LOPES, H. V.; TAVARES, W. Diagnóstico das infecções do Trato Urinário. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.51, n.6, p. 301-312, 2005.

MA, J.; ZENG, Z.; CHEN, Z.; XU, X.; WANG, X.; DENG, Y.; LU, D.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; LIU, J.; WANG, M. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among Ceftiofur-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from Companion and Food-Producing Animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 519–524, feb. 2009.

MANIKANDAN, S.; GANESAPANDIAN, S.; SINGH, M.; KUMARAGURU, A. K. Antimicrobial Susceptibility Pattern of Urinary Tract Infection Causing Human Pathogenic Bacteria. **Asian Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 56-69, 2011.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **The Lancet**, v. 351, Issue 9105, p.797-799, 1998.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; GARCÍA, I.; TRAN, J.; JACOBY, G. A. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 1037-1039, 2003.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 1. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MULVEY, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiology**, v. 4, p. 257-271, 2002.

NATARO, J. P.; KAPER, B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

NARCISO, A.; LITO, L.; CRISTINO, J. M.; DUARTE, A. *Escherichia coli* Uropatogênica: Resistência aos Antibióticos Versus Factores de Virulência. **Acta Urol**, v. 27, n. 2, p. 11-20, jul. 2010.

ORENSTEIN, R.; WONG, E. S. Urinary tract infections in adults. **American Family Physician**, v. 59, p. 1225-1234, 1999.

PAIVA, M. C.; NASCIMENTO, A. M.; CAMARGO, I. L. B. C.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; NARDI R. M. D. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107(5), p. 687-689, 2012.

PATTERSON, T. F., ANDRIOLE, V. T. Detection, significance, and therapy of bacteriuria in pregnancy: Update in the managed health care era. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.11, n.3, p. 593–608, 1997.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extend-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.4, p.657-686, out. 2005.

PITOUT, J. D. .; SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. Jr. Antimicrobial Resistance with Focus on  $\beta$ -Lactam Resistance in Gram-Negative Bacilli. **The American Journal of Medicine**, V. 103, P. 51–59, jul. 1997.

PITOUT, J. D.; WEI, Y.; CHURCH, D. L.; GREGSON, D. B.; Surveillance for plasmid-mediated quinolone determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 999-1002, 2008.

PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p.159-166, 2008.

RIOS, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; RODRIGUEZ-AVIAL, C.; HERNANDEZ, E.; PICAZO, J. J. High percentage of resistance to ciprofloxacin and *qnrB19* gene identified in urinary isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Madrid, Spain. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 4, p. 380-383, ago. 2007.

ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D. F.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p. 2872-2874, 2006.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, J. M. et al. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.5, p. 440-445, 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; CANO, M. E.; VELASCO, C.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.17, p. 149-182, 2011.

RONALD, A.; LUDWIG, E. Urinary tract infections in adults with diabetes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 287-292, 2001.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolone: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 1109-1117, 2003.

SANTO, E.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, S. Paulo, v. 48, n. 3, p. 185-188, 2006.

SØRENSEN, A. H.; HANSEN, L. H.; JOHANNESSEN, E.; SØRENSEN, S. J. Conjugative Plasmid Conferring Resistance to Olaquinox. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 798–799, Feb. 2003.

STAMM, W. E.; HOOTON, T. M. Management of urinary tract infections in adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 18, p. 1328-1334, 1993.

STAMM, W. E.; NORRBY, S. R. Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1-4, 2001.

STAPLETON, A. Urinary Tract Infections in Patients with Diabetes. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 80-84, 2002.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A, HOOPER, D. C.; ROBICSEK, A. Plasmid mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 664–89, 2009.

TAVARES, N. U. L.; BERTOLDI, A. D.; MUCCILO-BAISCH, A. L. Prescrição de antimicrobianos em unidades de saúde da família no Sul do Brasil. **Caderneta de Saúde Pública**, v.24, n.8, p. 1791-1800, 2008.

TIBA, M., R.; YANO, T.; LEITE, D. S. Caracterização genotípica de fatores de virulência em *Escherichia coli* a partir de estirpes de pacientes com cistite. **Revista do Instituto de Medicina tropical**, São Paulo, v. 50, n. 5, set./out. 2008.

TRAN, J. H.; JACOBY, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 8, p. 5638–5642, 2002.

TRAVERS, A.; MUSKHELISHVILI, G. A Global Transcriptional Regulator for Enterobacterial Growth? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 157-169, feb. 2005.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p. 256-280, 2005.

VILA, J.; RUIZ, J.; MARCO, F.; BARCELO, A.; GOÑI, P.; GIRALT E.; JIMENEZ de ANTA, T. Association between Double Mutation in *gyrA* Gene of Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli* and MICs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 10, p. 2477-2479, oct. 1994

WINN, JR. W. C. et al. **Koneman** – Diagnóstico microbiológico. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WANG, M. GUO, Q.; XU, X.; WANG, X.; YE, X.; WU, S.; HOOPER, D. C.; WANG, M. New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1892-1897, mai. 2009.

WARREN, J. W.; ABRUTYN, E.; HEBEL, J. R.; JOHNSON, J. R.; SCHAEFFER, A. J.; STAMM, W. E. Guidelines for Antimicrobial Treatment of Uncomplicated Acute Bacterial Cystitis and Acute Pyelonephritis in Women. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p.745–758, 1999.

YAMANE, K.; WACHINO, J. I.; SUZUKI, S.; KIMURA, K.; SHIBATA, N. KATO, H.; SHIBAYAMA, K.; KONDA, T.; ARAKAWA, Y. New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3354–3360, Sep. 2007.

YOSHIDA, H.; BOGAKI, M.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.34, p. 1271–1272, 1990.

ZORC, J. J.; KIDDOO, D. A.; SHAW, K. N. Diagnosis and Management of Pediatric Urinary Tract Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 417-422, apr. 2005.