

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

FRANCIANE GOMIG

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A QUINOLONAS EM *ESCHERICHIA COLI*
UROPATOGÊNICA COM FENÓTIPO LACTOSE NEGATIVO

Ponta Grossa

2013

FRANCIANE GOMIG

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A QUINOLONAS EM *ESCHERICHIA COLI*
UROPATOGÊNICA COM FENÓTIPO LACTOSE NEGATIVO

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Berton da Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Esmerino

Ponta Grossa

2013

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

G633 Gomig, Franciane
Análise da resistência a quinolonas em *Escherichia coli*
uropatogênica com fenótipo lactose negativo / Franciane Gomig Wazen.
Ponta Grossa, 2013.
66f.

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Esmerino

1. Resistência. 2. Quinolonas. 3. *Escherichia coli*. 4. lactose negativo.
5. biótipo I. Silveira, Rafael Bertoni da. II. Esmerino, Luiz Antonio. 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. 15/2013

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, pela candidata **FRANCIANE GOMIG**.

Aos dezesseis dias do mês de abril de dois mil e treze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, 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) **FRANCIANE GOMIG**, 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), Drª Katia Sabrina Paludo (UEPG) e Drª Marcia Helena Appel (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 a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Análise da Resistência a Quinolonas em *Echerechia Coli* Uropatogênica com Fenótipo Lactose Negativo**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. 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, 16 de abril de dois mil e treze.

Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira

Profª Drª Katia Sabrina Paludo

Profª Drª Marcia Helena Appel

Rafael Bertoni da Silveira
Katia Sabrina Paludo
Marcia Helena Appel

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Ricardo e
aos meus queridos filhos Gabriel e Pedro Mariano.

Agradecimentos

A Deus e à querida MTA por terem me concedido a vida e a oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao meu esposo Ricardo por toda sua paciência, dedicação e apoio de sempre, além de ser um pai dedicado, motivo pelo qual eu jamais teria conseguido concluir essa etapa. Amo muito você!

Aos meus filhos Gabriel e Pedro Mariano por serem meus pequenos companheiros, por renunciarem à minha companhia enquanto trabalhava e por preencherem a minha vida de alegria.

Aos meus pais Alberto e Terezinha e à minha irmã Thaísa, pelo incentivo e apoio para que eu continuasse meus estudos e pela dedicação para com a minha família nos períodos em que mais precisei.

À minha sogra Marlene, pela ajuda com meus filhos e minha casa em momentos que estive dedicada a este trabalho.

À Sueli por toda a disponibilidade e carinho, pela ajuda com minha casa e com meus filhos, meu sincero agradecimento.

A todos os familiares e amigos que compartilharam comigo as ideias, as frustrações, as alegrias e o desejo de efetuar mais essa etapa na minha carreira.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira, por ter confiado na minha disposição e capacidade em realizar esse trabalho, por ter me ajudado a aprender não somente a parte técnica, mas também a amadurecer pessoal e profissionalmente.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luiz Antonio Esmerino, pelo fornecimento das amostras para estudo e dos dados epidemiológicos, além dos pequenos favores da rotina diária.

Ao meu colega de laboratório Denis por seu companheirismo e compreensão quanto a minhas limitações e por toda sua ajuda para que este projeto fosse finalizado.

À Prof(a). Dr(a). Carolina Weigert Galvão e ao Prof. Dr. Rafael Mazer Etto pela ajuda nas muitas dúvidas durante os procedimentos de biologia molecular, pelas idéias e pela ajuda nas análises. Obrigada também pela acolhida em seu laboratório!

À Prof(a) Dra. Maria Luiza Tunes Buschini pelo auxílio na fase de análise estatística, por sua disponibilidade e boa vontade na arte de ensinar.

À querida Jana por seu apoio e alegria; à Larissa, Luiz e Monica pela ajuda nos experimentos, ao Adrian, Wellington e a todos os colegas dos laboratórios que trabalhei, por seu auxílio e pelos momentos de descontração e partilha.

Ao Marcelo Andrade Lima da Unifesp por seu auxílio, paciência e disponibilidade na etapa do sequenciamento. Também ao Valter da UFPR pela realização dos sequenciamentos.

Ao professor Silvio Zanata por ceder parte do material de laboratório.

À CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

À UEPG pelo suporte.

RESUMO

As infecções do trato urinário mostram uma elevada ocorrência na população, especialmente em mulheres, gestantes e idosos. O principal agente etiológico é a *E. coli*, principalmente nas infecções de origem comunitária. A terapia com antimicrobianos é realizada extensivamente com Quinolonas e o aparecimento de resistência é marcante e ascendente. Os principais mecanismos de resistência conhecidos em *E. coli* estão relacionados a mutações nas QRDR (Região Determinante de Resistência a Quinolonas) dos genes *gyrA* e *parC*, codificadores de subunidades das enzimas DNA Girase e Topoisomerase IV, respectivamente. Essas enzimas, que são os alvos de ação das Quinolonas, são responsáveis pelo superespiralamento e decatenação do DNA. Os genes plasmidiais que também estão envolvidos nos mecanismos de resistência são os *qnr* que codificam proteínas protetoras das enzimas alvo e o *aac(6')-Ib-cr*, que codifica uma enzima aminoglicosídeo acetiltransferase capaz de inativar a ciprofloxacina e norfloxacina. Neste trabalho foram analisadas 58 amostras de *E. coli* lactose negativas provenientes de urina, a fim de se traçar um perfil de resistência nessa população da região de Ponta Grossa e analisar os mecanismos de resistência envolvidos. Observou-se uma elevada taxa de resistência de 48%, dentre as quais 79% foram resistentes a todas as quinolonas testadas: ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina. Pode-se observar também uma relação direta entre os biótipos 971 e uma maior resistência e o biótipo 981 e uma maior sensibilidade, motivo pelo qual não seria recomendável o uso de Quinolonas para o tratamento de infecções causadas por *E. coli* biótipo 971. Pela análise molecular, para as amostras multirresistentes, foram encontradas mutações com substituição de aminoácido nos genes *gyrA* nos códons 83 e 87 e no gene *parC* uma única mutação, sendo essa no códon 80 para três cepas e no códon 84 para uma cepa. Mutações apenas no gene *gyrA* apareceram para amostras resistentes somente ao ácido nalidíxico. Esses dados estão de acordo com a teoria de que o acúmulo de mutações leva a um aumento da resistência às quinolonas. Os genes plasmidiais *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* não foram encontrados.

Palavras-Chave: resistência, quinolonas, *Escherichia coli*, lactose negativo, biótipo

ABSTRACT

Urinary tract infections show a high incidence in the population, mainly in women, the elderly and pregnant women. The main etiological agent is *E. coli*, especially in Community infections. Antimicrobial therapy is performed extensively with the Quinolones and resistance emergence is striking and upward. It is known *E. coli* resistance mechanisms are related with QRDR (Quinolone Resistance Region Determining) mutations in *gyrA* and *parC* genes that are the drug targets. These genes encode respectively DNA Girase and Topoisomerase IV subunits responsible for DNA supercoiling and DNA decatenating. Another resistance mechanism that come from plasmids is *qnr* genes encoding a protein that can protect DNA girase and Topoisomerase IV. Another plasmidial gene is *aac(6')-Ib-cr* encoding an aminoglycoside acetyltransferase that can inactivate ciprofloxacin and norfloxacin. This study analyzed 58 *E. coli* lactose negative samples from urine, in order to draw a profile of resistance in this population from the region of Ponta Grossa and analyze the resistance mechanisms involved. There was a high resistance rate of 48%, among which 79% were resistant to all quinolones tested: nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin. There was also a direct relationship between the biotypes 971 and resistance in contrast to biotype 981 and sensitivity. Therefor Quinolones are not recommended in infection due to *E. coli* biotype 971. On molecular analysis on the multiresistant samples mutations with aminoacid substitution were found in three positions: the *gyrA* gene at codons 83 and 87 and in the *parC* gene at codon 80 in three strains and at codon 84 on a single strain. Mutations only at *gyrA* gene appeared for a sample resistant just to nalidixic acid. These facts are according to the theory of mutations accumulation causing increased resistance to quinolones. Plasmidial genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* were not found in these strains.

Keywords: bacterial resistance, quinolones, *Escherichia coli*, lactose negative, biotype

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dinâmica entre UPEC invasora e o hospedeiro numa ITU.....	20
Figura 2	Estrutura química geral das Quinolonas.....	21
Figura 3	Estrutura química das moléculas de Fluorquinolonas.....	22
Figura 4	Representação esquemática da função das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV no superespiralamento e na decatenação do DNA.....	24
Figura 5	Distribuição das amostras quanto ao sexo.....	45
Figura 6	Distribuição das amostras quanto à faixa etária.....	46
Figura 7	Perfil de Resistência às Quinolonas.....	46
Figura 8	Perfil dos biótipos encontrados.....	47
Figura 9	Relação dos biótipos com a suscetibilidade a Quinolonas.....	47
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose (2%) da cepa de E.coli utilizada para padronização e como controle da PCR multiplex.....	49
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose (2%) das amostras GF01 a GF73 resistentes a Quinolonas.....	49
Figura 12	Eletroforese em gel de agarose (2%) das amostras GF10 a GF78 resistentes a Quinolonas.....	50
Figura 13	Alinhamento das sequências de DNA provenientes do gene <i>gyrA</i> e dos códons correspondentes.....	51
Figura 14	Alinhamento das sequências de DNA provenientes do gene <i>parC</i> e dos códons correspondentes.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o PCR Multiplex.....	35
Quadro 2	Relação do Perfil de Resistência e das mutações obtidas através do sequenciamento das QRDR.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
Ala	Alanina
Amc	Amoxicilina + ácido clavulânico
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico ou Aspartato
Asn	Asparagina
Atm	Aztreonam
C	Citosina
Caz	Ceftazidima
CIM	Concentração inibitória mínima
Cip	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Ctx	Cefotaxima
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
ESBL	β -lactamases de espectro ampliado
G	Guanina
FQ	Fluorquinolonas
Gly	Glicina
I	Intermediário
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Nal	Ácido nalidixico
Nor	Norfloxacina
PCR	<i>"Polymerase Chain Reaction"</i> , Reação em cadeia da polimerase
Pro	Prolina
PAI	Ilhas de patogenicidade
pb	Pares de bases
PRP	Pentapeptídeo repetido
QRDR	Região Determinante de Resistência a Quinolonas
R	Resistente
S	Sensível

SAP	<i>"Shrimp Alkaline Phosphatase"</i> , fosfatase alcalina
Ser	Serina
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Thr	Treonina
TSA	<i>"Tryptic soy agar"</i> , Ágar tríptico de soja
Tyr	Tirosina
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
Val	Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
5. RESULTADOS	37
CAPÍTULO I - Análise da resistência a quinolonas em	
<i>Escherichia coli</i> uropatogênica com fenótipo lactose negativo na cidade de	
Ponta Grossa, Brasil	
Resumo	37
Abstract	38
Introdução	39
Material e Métodos	40
Resultados	41
Discussão	45
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	60

1. INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) são a segunda causa de infecções na população brasileira, perdendo apenas para as infecções do trato respiratório. As ITU estão presentes em todos os grupos populacionais, mas predominam em mulheres, idosos, gestantes e indivíduos hospitalizados submetidos a procedimento invasivo. O principal agente etiológico é a *Escherichia coli*, objeto desse trabalho, principalmente nas ITU comunitárias, isto é, não relacionadas a ambientes hospitalares.

Devido ao uso extensivo de antimicrobianos para o tratamento das ITU, o qual muitas vezes é realizado de maneira equivocada ou sem indicação médica, o aparecimento de cepas resistentes tem sido cada vez maior e mais rápido. Os antimicrobianos comumente utilizados para tal são as quinolonas e fluorquinolonas, com destaque para a ciprofloxacina e norfloxacina. A resistência bacteriana a esses medicamentos vem aumentando consideravelmente desde o início do uso pela população. Diversos estudos têm sido realizados com a perspectiva de se elucidar os mecanismos de resistência às quinolonas para se ter um conhecimento mais aprofundado da situação e assim avaliar como essa resistência pode estar se disseminando, se há grupos mais suscetíveis, determinar formas de combate e controle, bem como melhorar as novas drogas que venham a ser lançadas. Nesse sentido, foram encontrados mecanismos de resistência cromossomais, envolvendo mutações pontuais e de efeito aditivo, e plasmidiais, com a produção de proteínas protetoras das enzimas alvo e, mais recentemente, de enzimas inibidoras da atividade das quinolonas.

Sendo assim, é de extrema importância o estudo dos mecanismos de resistência existentes em determinadas regiões, a fim de se avaliar o quanto o processo de evolução destes mecanismos permite o uso irrestrito das quinolonas. Além disso, é possível avaliar se genes de resistência plasmidial, os quais são transferíveis horizontalmente, estão presentes ou em ascensão na população em questão.

O estudo epidemiológico e molecular para avaliar quais formas de resistência estão presentes em determinada população é importante e necessário, visto que colabora para a contenção dessa problemática na região.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DEFINIÇÃO DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

As infecções do trato urinário são caracterizadas pela presença de bactérias nas vias urinárias que, na maioria dos casos, ascende da região externa da uretra. Elas podem acometer apenas o trato urinário inferior, sendo assim denominadas cistites, ou atingir o trato urinário superior, originando as pielonefrites. Habitualmente, as cistites são consideradas infecções não complicadas, enquanto que as pielonefrites são consideradas complicadas, pois devem-se à ascensão de microrganismos do trato urinário inferior para o superior e em geral está associada à presença de cálculos renais (LOPES e TAVARES, 2005).

2.2. SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO

As cistites exteriorizam-se clinicamente pela presença de disúria, urgência miccional, dor suprapúbica, além de piúria e hematúria em alguns casos. Por outro lado as pielonefrites podem, além desses sintomas, apresentar febre alta, calafrios e dor lombar (LOPES e TAVARES, 2005).

A confirmação do diagnóstico de ITU se dá pela urocultura. Vale ressaltar a importância de alguns cuidados para que esse exame possa revelar com acuracidade a existência ou não de um quadro infeccioso e qual o agente etiológico em questão. Desse modo, a coleta deve ser realizada pela manhã, após higiene íntima e deve ser coletado o jato médio. Em primeiro lugar, a coleta deve ser realizada preferencialmente pela manhã, já que a bexiga não foi esvaziada por um período mais longo de tempo, o que leva a uma maior concentração de bactérias na urina. A higienização da região externa é também muito importante, pois esse local é a fonte dos contaminantes da amostra, além de que um mesmo microrganismo pode ser um contaminante ou o agente infeccioso, dependendo da circunstância. A coleta do jato médio evita a contaminação da amostra por microrganismos que ainda estejam presentes na região externa mesmo após a higienização. Além de todos esses cuidados, a urina coletada deve ser enviada imediatamente ao laboratório e, neste, processada o quanto antes. Caso isso não seja possível, a urina deve ser mantida sob refrigeração a fim de diminuir a taxa de crescimento populacional bacteriana. A

urina é então semeada em placa de meio de cultura segundo o método da alça calibrada e após o período de incubação de 18-24h a 37°C, um crescimento superior a 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) confirma o quadro infeccioso. Outra forma de se avaliar, porém sem confirmar, a presença de uma ITU é através do parcial de urina com a análise do sedimento urinário. Embora não sejam comparáveis à urocultura, são exames mais rápidos e dão algumas informações que, juntamente com o exame clínico, podem auxiliar no fechamento do diagnóstico. Um parcial de urina com a presença de leucócitos, hemácias, bactérias e nitritos mostram fortes indícios da ocorrência de um quadro de ITU (ORENSTEIN E WONG, 1999).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

As ITU são afecções de grande ocorrência na população e devido ao fato de nem sempre ser realizado o exame de cultura de urina para a confirmação do diagnóstico, a sua incidência é difícil de ser precisada. No entanto, alguns estudos como o de Tavares e colaboradores (2008) 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. Além disso, segundo a Sociedade Brasileira de Infectologia e a Sociedade Brasileira de Urologia, as ITU são a segunda maior causa de consultas médicas devido a infecções. Nos Estados Unidos, mais de sete milhões de consultas e cerca de 1 milhão de atendimentos emergenciais se devem a essas infecções (FOXMAN *et al.*, 2002). Alguns estudos realizados no Brasil podem dar uma perspectiva da frequência dessas infecções na população. No estado da Bahia no período de 2006 a 2008 foi mostrada uma frequência de 28,9% (COSTA *et al.*, 2010), enquanto que no Paraná em 2005 foi encontrada uma taxa menor, de 15,85% (MULLER *et al.*, 2008) e no Estado de São Paulo em 2003, 18,82% (ALMEIDA, SIMOES, RADDI, 2007). Variações como estas podem acontecer devido a características locais da população e do serviço de saúde disponível, bem como de acordo com a origem das amostras, provenientes de ambiente hospitalar ou comunitário.

Dessa maneira, os estudos nessa área são de grande importância e relevância, pois, além das ITU se apresentarem como um problema de saúde que debilita o seu portador, são gerados elevados custos aos sistemas de saúde devido a consultas, internações e tratamentos.

Os grupos mais suscetíveis a ITU são: mulheres, gestantes, idosos, hospitalizados e diabéticos.

Estudos apontam que 20 a 30% das mulheres terão ao menos um episódio de ITU na vida (KUNIN, 1994); já outros mostram que 40 a 50% das mulheres adultas apresentam episódios dessa doença. A principal explicação para esses dados está na anatomia do sistema urinário feminino, o qual possui uma uretra curta, deixando a bexiga próxima ao ambiente externo do corpo. Além disso, a uretra está muito próxima ao canal anal e vaginal, amplamente colonizados por suas microbiotas específicas. Nesse sentido, os fatores de risco mais importantes para a contração de uma ITU são: relações sexuais recentes, uso de diafragma, espermicidas ou preservativos, além de um histórico recente de ITU (HOOTON, 2000).

As gestantes podem contrair uma ITU devido às mudanças fisiológicas na anatomia do trato urinário durante esse período. Estas podem permitir a existência desde uma bacteriúria assintomática até uma pielonefrite, levando muitas vezes a um parto prematuro. Além disso, as variações no sistema imunológico durante a gravidez são amplas, fato esse que facilita o aparecimento das infecções urinárias (PATTERSON e ANDREOLI, 1997A).

Já os idosos de ambos os sexos podem ser acometidos por essas infecções devido a uma higiene precária, à maior propensão à bacteriúria assintomática e à associação a outros problemas de saúde. Ainda nesse grupo há maior risco de recorrências e, conseqüentemente, falhas terapêuticas (ARIATHIANTO, 2011).

Os indivíduos hospitalizados são um grupo bastante vulnerável às ITU, devido a sua condição debilitada. As ITU 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).

Mulheres portadoras de diabetes têm maior risco de desenvolverem ITU ao longo da vida que homens diabéticos (PATTERSON e ANDREOLI, 1997B). Além disso, pacientes diabéticos têm mais chances de apresentar bacteriúria assintomática, a qual pode levar a um quadro de ITU que facilmente pode evoluir para complicações renais (RONALD e LUDWIG, 2001).

2.4. AGENTES ETIOLÓGICOS

2.4.1. Principais agentes

Cerca de 95% dos agentes etiológicos das ITU são provenientes da microbiota do entorno da uretra (RONALD, 2003). Sendo assim, os principais patógenos responsáveis pelas ITU são a *Escherichia coli*, abrangendo cerca de 80% dos casos fora do ambiente hospitalar, seguido por *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* e *Enterococcus faecalis* (LOPES e TAVARES, 2005). No ambiente hospitalar ainda outros microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp.* e *Candida spp.* estão associados às ITU (ALÓS, 2005).

2.4.2. *E. coli* Uropatogênicas e Patogenia das ITU

A *E. coli* é um bacilo gram-negativo pertencente ao grupo das Enterobactérias, apresentando assim as seguintes características: capacidade de fermentação da glicose, citocromo oxidase negativa e redução do nitrato a nitrito. Vários outros testes bioquímicos podem ser realizados mostrando características distintas de fermentação e a utilização de diversos substratos. A *E. coli* tem como características bioquímicas principais a produção de indol (98%) e a incapacidade de utilizar o citrato como fonte exclusiva de carbono (1%). Outras provas, como fermentação de ramnose (80%), ou a descarboxilação da ornitina (65%) ou a motilidade (95%) são variáveis, dependendo da cepa. Quanto à capacidade de fermentar a lactose, 5% são consideradas lactose negativas (WINN Jr et al., 2006). Devido à grande diversidade existente dentro dessa espécie bacteriana, torna-se comum a utilização do termo biótipo que significa o conjunto de linhagens, ou seja, de isolados específicos, dentro de uma mesma espécie (FOX, 2011).

A *E. coli* é considerada um organismo ubíquo, podendo ser naturalmente encontrada no ambiente e no homem, colonizando o intestino humano. Estas vivem em relação simbiótica com o homem, auxiliando no equilíbrio da microbiota intestinal. No entanto, algumas estirpes podem divergir e apresentar mecanismos que promovam o estabelecimento e invasão de tecidos extraintestinais, as denominadas *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC), causando assim doenças. É o caso das cepas de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) que agem como oportunistas, mediante

falhas na defesa do hospedeiro ou pelo simples fato de conseguirem chegar aos tecidos do trato urinário (WILES *et al.*, 2008).

Após muitos estudos acerca dos mecanismos que promovem a patogenicidade das UPEC, foram descobertos diversos genes que estão frequentemente dentro de regiões chamadas de ilhas de patogenicidade (PAI). Eles codificam os então denominados fatores de virulência, tais como as adesinas, os sistemas de aquisição de ferro, as toxinas e os antígenos de cápsula. As adesinas, como a fímbria tipo 1, fímbria P, S, F1, C e os antígenos-Dr, são responsáveis pela adesão ao tecido do hospedeiro, bem como pela sinalização necessária para a invasão da célula. Os sistemas de aquisição de ferro são compostos pelas aerobactinas, enterobactinas e yersinibactinas, as quais são estruturas que tem alta afinidade pelo ferro. As toxinas, como a hemolisina e os autotransportadores Vat e Sat promovem uma série de eventos celulares que podem levar à morte celular, bem como à ativação da resposta imune do hospedeiro. Por fim, os antígenos O, somáticos e que definem o sorogrupo da estirpe, os antígenos K, do polissacarídeo capsular, e os antígenos H, flagelares, estão envolvidos na ativação da resposta imune, sendo que alguns desses antígenos são mais frequentes em UPEC (OELSCHLAEGGER *et al.*, 2002; WILES *et al.*, 2008).

Conforme citado anteriormente, a região periuretral está amplamente colonizada por *E. coli* provenientes do intestino, além daquelas que colonizam o canal vaginal. Por via ascendente, elas podem chegar ao interior da bexiga e serem eliminadas pelo fluxo urinário ou podem, através de suas fímbrias, interagir com as células epiteliais e então iniciar o processo de invasão. Ao mesmo tempo, toxinas são liberadas e provocam a morte das células mais superficiais. Essa etapa inicial permite o desnudamento do tecido de revestimento da bexiga, deixando à mostra as células mais jovens, ao mesmo tempo em que muitas células infectadas são eliminadas, numa tentativa de diminuir o número de agressores. Nesse ínterim, a invasão das células mais jovens faz com que o quadro infeccioso se instaure. Dentro da célula do hospedeiro, a bactéria internalizada se multiplica e faz uma espécie de comunidade, até eclodir e invadir outras células vizinhas (WILES, 2008).



Figura 1: Dinâmica entre UPEC invasora e o hospedeiro durante uma ITU. Primeiramente, a bactéria ascende a via urinária e chega até a bexiga. (1)- fímbrias Tipo 1 (verde) são responsáveis pelo reconhecimento das células do epitélio vesical e também por secretar toxinas e outros fatores de virulência (2) sobre as células epiteliais. Enterobactinas (3, estruturas azuis) são liberadas para captar ferro em competição com moléculas quelantes de ferro do hospedeiro. (4) Então, ocorre a invasão das células da camada mais externa, mediada pela fímbria Tipo 1, seguida de extensa multiplicação dentro dessas células, formando comunidades semelhantes a um biofilme. (5) A exfoliação das células infectadas facilita a retirada das UPEC do local, porém deixa as células da camada inferior, com células mais imaturas, suscetível a invasão, o que contribui para a persistência e disseminação delas pelo tecido do trato urinário. (6) A resposta imune do hospedeiro, com a migração de neutrófilos para a área, é uma tentativa de eliminação dos agentes invasores e o processo inflamatório vai se instaurando na região afetada. (Fonte: WILES, 2008).

2.5. TERAPÊUTICA DAS ITU

O esquema terapêutico das ITU é realizado tendo em vista a idade, o sexo do indivíduo e suas condições de saúde. Em mulheres jovens, com cistites não complicadas, o esquema terapêutico realizado em dose única ou em três dias tem se mostrado bastante eficaz em relação àqueles em que são necessários sete dias ou mais. A vantagem de uma terapia de um ou três dias é a maior adesão do paciente ao tratamento com menos efeitos colaterais. Para os esquemas de três dias são indicados sulfametoxazol-trimetropim (800/160 mg de 12 em 12 horas) e uma variedade de Fluorquinolonas (FQ) como: norfloxacin (400mg de 12 em 12 horas), ofloxacin (200 a 400 mg de 12 em 12 horas), ciprofloxacina (500 mg de 12 em 12 horas), levofloxacina (400 mg), gatifloxacina (500 mg), lomefloxacina (400 mg) e

pefloxacin (400 mg). Para os esquemas de dose única são indicadas a fosfomicina trometamol (3 g) e as FQ pefloxacin (400 mg), ciprofloxacina (500 mg), ofloxacina (400 mg), gatifloxacina (500 mg). Os esquemas de sete dias ou mais são considerados alternativos para este grupo de indivíduos e consiste no uso de β -lactâmicos, nitrofurantoína e da quinolona ácido pipemídico. Outros grupos, como o de mulheres grávidas, diabéticos, homens e idosos, possuem um esquema terapêutico próprio em relação a dosagem e duração de tratamento, com algumas restrições dependendo do grupo, porém os fármacos utilizados são os mesmos já mencionados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA e SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2004)

2.6. QUINOLONAS E FLUORQUINOLONAS

2.6.1. Origem e Classificação

As quinolonas são antimicrobianos sintéticos e foram descobertos na década de 60, dentro dos compostos secundários na produção do antimalárico cloroquina. O primeiro representante desta classe foi o ácido nalidíxico, lançado em 1962, com atividade contra bacilos gram-negativos (BGN) (LESCHER *et al.*, 1962). A Figura 2 mostra a estrutura química central desses antimicrobianos.

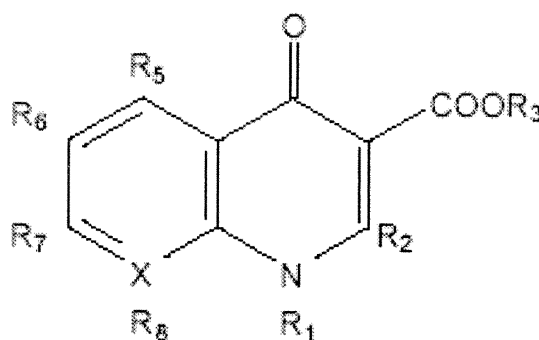


Figura 2: Estrutura química geral das Quinolonas (Fonte: SMITH *et al.*, 2001)

Na segunda geração surgiu o ácido oxolínico e o ácido pipemídico que são modificações químicas do anel original, as quais permitiram o aumento do espectro de atividade que, mesmo assim, ainda continuava restrito (VAN BAMBEKE *et al.*, 2005).

Posteriormente, foram lançadas as FQ, quinolonas de terceira geração, que apresentam um átomo de Flúor como substituinte na posição R6. Alguns dos

representantes dessa geração são a norfloxacin, ciprofloxacina, e levofloxacina. A mudança estrutural das FQ nessa geração permitiu o aumento do espectro de atividade para os gram-positivos e produziu um aumento na solubilidade, o que permitiu seu uso em soluções oftálmicas (VAN BAMBEKE *et al.*, 2005).

A quarta geração, representada pela moxifloxacina e gatifloxacina, pela adição de um radical metoxi na posição R8, levou a uma diminuição do efluxo do fármaco de dentro das bactérias, bem como um aumento da potência para cocos gram-positivos (CGP) resistentes às quinolonas de terceira geração (CHIDE e ORISAKWE, 2007). A Figura 3 mostra a estrutura química de algumas FQ.

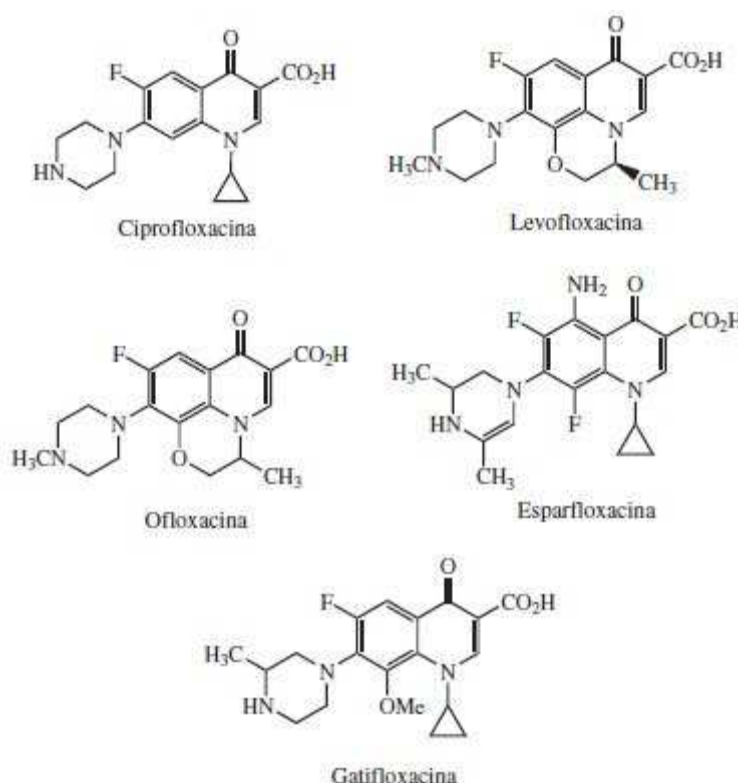


Figura 3: Estrutura química das moléculas de Fluorquinolonas. Note que, para todas elas, em R6 há uma molécula de Flúor (Fonte: ROCHA *et al.*, 2011).

2.6.2. Mecanismo de ação

As quinolonas têm ação bactericida ao inibir a síntese de DNA. Elas atuam sobre as enzimas DNA-girase e Topoisomerase IV, as quais atuam juntas na replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA. A DNA girase é uma proteína tetramérica que possui duas subunidades GyrA e GyrB, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e tem como principal função permitir o superespiralamento da dupla fita,

tornando-a compacta o suficiente para caber dentro da célula bacteriana. A DNA girase introduz torções negativas na super-hélice do DNA bacteriano dupla-fita. Sua capacidade de realizar a quebra das duas fitas de DNA passando uma por dentro da outra e reunindo-as novamente leva ao superespiralamento do DNA e também auxilia nos processos de transcrição e recombinação do DNA, bem como na separação dos cromossomos. Sua atividade é essencial para a iniciação da replicação do DNA e permite a ligação de proteínas de iniciação (KAMPRANIS *et al.*, 1999). A Topoisomerase IV também é uma proteína tetramérica, com duas subunidades ParC e ParE, estas codificadas pelos genes *parC* e *parE*, homólogos a *gyrA* e *gyrB*. Sua função está envolvida no processo de replicação e decatenação das fitas replicadas durante a divisão celular. A Topoisomerase IV é capaz de introduzir torções positivas no DNA durante a replicação a fim de liberar a tensão que a forquilha de replicação introduz sobre a molécula. Com sua capacidade de cortar a dupla-fita de DNA e religá-la novamente, realiza a remoção da interligação dos cromossomos replicados, permitindo assim a segregação deles em duas células filhas (KATO *et al.*, 1992). A figura 4 ilustra a função da DNA girase e da Topoisomerase IV de maneira esquemática.

As quinolonas agem nessas duas enzimas, formando um complexo droga-enzima-DNA, através da interação dos radicais R1 e R7 com os aminoácidos das posições 83 e 87 de GyrA, no caso da DNA girase, levando ao rompimento da dupla fita de DNA através do bloqueio físico do movimento da forquilha de replicação e dos complexos de transcrição, deflagrando assim diversos eventos, como a exposição das extremidades de DNA derivadas da quebra da fita, resultando na morte celular. (HOOPER, 2000; DRLICA *et al.*, 2009).

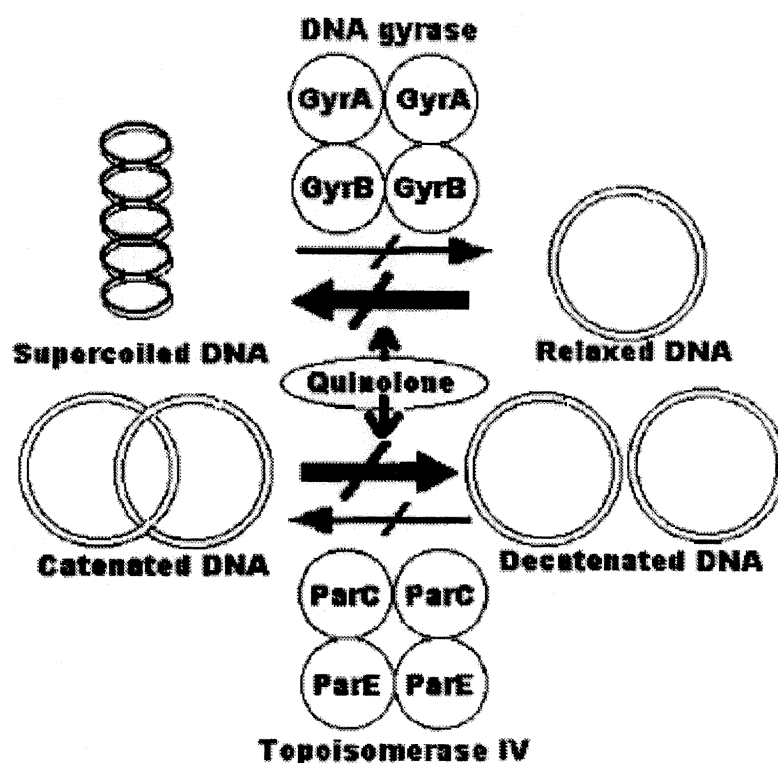


Figura 4: Representação esquemática da função das enzimas DNA girase e Topoisomerase II no superespiralamento e na decatenação do DNA. (Fonte: HOOPER, 1999)

2.7. RESISTÊNCIA A QUINOLONAS

Logo que o uso dessa classe de antimicrobianos foi difundido, apareceram relatos de cepas bacterianas resistentes, fato decorrente da pressão seletiva do meio. Primeiramente, organismos menos sensíveis passaram a apresentar resistência a quinolonas, como *Staphylococcus spp.* e *Pseudomonas spp.*, e posteriormente os mais sensíveis como os membros do grupo *Enterobacteriaceae*. (THOMSON *et al.*, 1994). A resistência a FQ na Europa aumentou particularmente em pacientes com ITU e em pacientes com câncer que utilizavam esses fármacos como profilaxia para infecções. Por outro lado, foram encontradas *E. coli* resistentes nas fezes de indivíduos que nunca fizeram uso de quinolonas e não hospitalizados, sugerindo que a aquisição dessas cepas se deu através de água ou alimentos (HOOPER, 2001). Reforçando essa hipótese, foram encontradas cepas resistentes provenientes de indivíduos que vivem em regiões isoladas da Amazônia sem acesso a esses antimicrobianos (PALLECHI *et al.*, 2012).

No Brasil, Lopes e colaboradores (1998) realizaram um levantamento da taxa de resistência a FQ em Enterobactérias e *Staphylococcus* de origem de ITU hospitalar e comunitária entre os anos de 1983 a 1994, mostrando um aumento gradual na

frequência de resistência a Norfloxacin e Cirpofoxacin no decorrer dos anos, passando de 3,2% para 9,1% e 7,4% para 16,5%, respectivamente. Na América Latina e no Brasil entre os anos de 1997 e 2001 foi realizado um grande estudo de Vigilância, o Programa SENTRY, que levantou dados de resistência a diversos antimicrobianos e foi encontrado que no Brasil cerca de 10% das *E. coli* provenientes de diversos sítios de infecção eram resistentes a Ciprofloxacina (SADER *et al.*, 2004). Um trabalho recente apenas com mulheres com cistite revelou índices de resistência ao Ácido Nalidíxico de 24,6% e à Ciprofloxacina de 10,8% no Brasil (SCHITO *et al.*, 2009). Em outros países, como a Turquia e o Irã, as taxas de resistência ao Ácido Nalidíxico foram de 17,0% e 49,3%, respectivamente (ARSLAM *et al.*, 2005 e AKBARI-NAKHJAVANI, *et al.*, 2007), ressaltando a diversidade que pode ocorrer entre diferentes regiões e a importância de se ter um levantamento local para conhecimento e monitoramento da resistência. Na cidade de Ponta Grossa o último trabalho publicado com amostras de urina se deu no ano de 2001, o qual revelou uma taxa de resistência de 11,6% para Norfloxacin em amostras comunitárias e 15,8% nas hospitalares (BAIL, ITO, ESMERINO, 2006).

Esses dados epidemiológicos mostram uma grande variabilidade da frequência da resistência na população mundial. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pela resistência a quinolonas e que levam a esse quadro epidemiológico. Até então já foram encontrados vários mecanismos de resistência, devido a genes cromossomais e plasmidiais, os quais serão expostos a seguir.

2.7.1. Mecanismos de resistência cromossomais

Os mecanismos de resistência cromossomais estão relacionados com as mutações nas enzimas alvo, bem como com a hiperexpressão dos genes de bombas de efluxo e com a diminuição da permeabilidade da membrana.

2.7.1.1. Mutações nas enzimas alvo

Conforme exposto anteriormente, as quinolonas agem diretamente sobre as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV. Sendo assim, a ocorrência de mutações nos genes que codificam essas enzimas podem levar a alterações estruturais que interfiram na interação da droga com seu alvo.

É importante ressaltar que em bactérias Gram-negativas, a DNA-girase é o alvo

primário de ação das quinolonas, enquanto que a Topoisomerase IV é um alvo secundário. Já em Gram-positivas, ocorre uma inversão desses papéis. Vários estudos foram realizados para a comprovação desse fato e um deles foi realizado com essas enzimas purificadas e isoladas de *S. aureus*, o qual demonstrou que a Topoisomerase IV se mostrava mais sensível à ação de seus inibidores (cirpofloxacina e sparfloxacina) que a DNA girase (BLANCHE, *et al.*, 1996).

Portanto, o gene *gyrA* é o principal alvo das quinolonas em *E.coli* e será um dos objetos de estudo desse trabalho.

2.7.1.2. Mutações na DNA girase

No final da década de 80, estudos moleculares revelaram os primeiros mecanismos de resistência cromossomal. Foi demonstrado que no gene *gyrA* existe uma região denominada Região Determinante de Resistência a Quinolonas (QRDR). Esta pertence à região codificadora das cadeias de superfície da enzima, as quais são responsáveis pela função enzimática, como o sítio de atividade Tyr122, local onde ocorre a reação do DNA com a DNA girase (YOSHIDA *et al.*, 1990). Sendo assim, mutações no códon 83 e 87, que provocam substituição dos aminoácidos, são críticos para o surgimento de resistência, já que é exatamente nesta região em que há a interação enzima-quinolonas. Assim, as mutações nesses locais mesmo que pontuais são determinantes, já que resultam numa diminuição da afinidade da droga pelo seu alvo (WILLMOTT e MAXWELL, 1993).

Trabalhos posteriores demonstram que uma única mutação em *gyrA* pode conferir resistência ao Ácido Nalidíxico e aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das FQ. Mais que uma mutação nesta enzima e/ou mutações em outros alvos conferem resistência ao Ácido Nalidíxico e às FQ em geral (JACOBY, 2005; McDONALD *et al.*, 2001; EVERETT *et al.*, 1996).

O gene *gyrB* também possui uma QRDR sendo que as mutações neste também corroboram para a formação de cepas resistentes (YOSHIDA *et al.*, 1991). As mutações em *gyrB*, são um mecanismo adicional de resistência, pois sozinhas não são capazes de tornar uma bactéria resistente, apenas junto a alterações no gene *gyrA*.

2.7.1.3. Mutações na Topoisomerase IV

As mutações na Topoisomerase IV são outro mecanismo de contribuição para a resistência a quinolonas em gram-negativos, já que sozinhas não são capazes de gerar cepas resistentes, devido ao fato dessa enzima ser o alvo secundário nesse grupo de microrganismos, conforme exposto anteriormente. O gene *parC* apresenta uma QRDR análoga à de *gyrA* e as substituições nos códons 78, 80 e 84 podem estar envolvidas no processo de bloqueio da síntese de DNA. O gene *parE* apresenta pouca relevância perante os demais para a resistência a quinolonas (HOOPER, 1999).

2.7.1.4. Hiperexpressão de bombas de efluxo

As bombas de efluxo são complexos multiprotéicos e dependentes de energia. Em bactérias Gram-negativas são formadas por três componentes: a bomba de efluxo na membrana celular, a proteína de membrana externa e uma proteína de ligação entre estas duas que passa pelo espaço periplasmático. A maioria das bactérias possui bombas de efluxo constitutivamente, como um mecanismo de defesa contra agentes tóxicos, e a sua hiperexpressão pode estar relacionada à resistência a antimicrobianos. Em *E. coli*, os genes responsáveis pela codificação das proteínas que compõem as bombas de efluxo e também de seus reguladores, quando apresentam certas mutações, estão diretamente ligados ao aparecimento de resistência a antimicrobianos. Este mecanismo de ação está bastante envolvido em casos de multirresistência, nas quais várias classes de fármacos tornam-se ineficientes, devido ao fato dessas bombas de efluxo não serem seletivas. No caso específico das FQ, essas bombas têm um efeito de redução da atividade do fármaco, resultando em baixos níveis de resistência. Porém, em concomitância com as mutações em *gyrA*, esses níveis aumentam. Assim é comum que cepas multirresistentes apresentem este mecanismo de resistência (HOOPER, 1999; HOOPER, 2001; JACOBY, 2005).

2.7.1.5. Diminuição da permeabilidade da membrana celular

Uma outra maneira pela qual as bactérias podem se proteger de agentes

tóxicos é através da diminuição da permeabilidade da membrana. Para alcançar seu alvo, as quinolonas necessitam atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática, além da membrana externa em Gram-negativos. As porinas localizadas na membrana externa são proteínas-canal que transportam moléculas por difusão passiva. Em *E. coli* as principais porinas são a OmpA, OmpC e OmpF e a diminuição da expressão desta última está relacionada a cepas resistentes a quinolonas e beta-lactâmicos (JACOBY, 2005).

2.7.2. Mecanismos plasmidiais

Atualmente há três formas conhecidas de resistência a quinolonas através de genes transferíveis por plasmídios. A primeira é através dos genes *qnr* que codificam uma proteína com função de proteger as enzimas alvo DNA-girase e Topoisomerase IV. A segunda é através do gene *aac(6')-Ib-cr*, o qual codifica uma enzima, a aminoglicosídeo-acetiltransferase, a qual é capaz de inibir a atividade da ciprofloxacina e norfloxacina. A terceira é através de genes plasmidiais codificadores de bombas de efluxo OqxAB e QepA.

2.7.2.1. Proteínas Qnr

No fim dos anos 90, nos Estados Unidos, foi descoberto um novo gene dentro de um plasmídio, o gene *qnr*, que codificava uma proteína Qnr (Quinolone Resistance) (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 1998). Posteriormente essa proteína foi chamada de QnrA, a primeira das diversas outras encontradas posteriormente. 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 até hoje 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 71 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 e 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 proteínas Qnr pertencem à família dos pentapeptídeos repetidos (PRP), as quais são formadas por repetições de séries de cinco aminoácidos. As proteínas Qnr são formadas por dois domínios de pentapeptídeos separados por um único aminoácido, usualmente a glicina (STRAHILEVITZ *et al.*, 2009). 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 vem sendo estudado e sabe-se que elas têm um efeito protetor da DNA girase e da Topoisomerase IV. Alguns ensaios realizados utilizando a proteína QnrA purificada revelaram que sua atividade se dá mediante a presença das quinolonas, de modo que existe uma interação com a DNA Girase e Topoisomerase IV que minimiza as oportunidades para a formação do complexo letal girase-DNA-quinolona. Essa interação parece ser dependente da quantidade disponível da própria proteína Qnr (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Sendo assim, essa ação protetora produz apenas um efeito de aumento da CIM de quinolonas e FQ. Cepas resistentes possuem mais um mecanismo de ação envolvido, além das proteínas Qnr, e assim como alguns outros acima citados, este é um mecanismo contribuinte, 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, sugerindo a possibilidade de haver uma competição das proteínas Qnr pela ligação à DNA girase (HU, *et al.* 2008)

2.7.2.2. Enzima aminoglicosídeo-acetiltransferase

No ano de 2006 foi descoberta uma variante da enzima aminoglicosídeo acetiltransferase, codificada pelo gene *aac(6')-Ib-cr* que estava envolvida com o aumento da CIM de Ciprofloxacina e Norfloxacina. Os estudos revelaram que ela é

capaz de agir sobre essas FQ por estas apresentarem um substituinte piperazinil, com um nitrogênio amínico secundário, local de ação da enzima. Essa nova variante de aminoglicosídeo acetiltransferase promove a acetilação dessa amina secundária, culminando na perda de função do fármaco (ROBICSEK *et al.*, 2006A)

O aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) conferido pela AAC(6')-Ib-cr é menor que aquele gerado pelas proteínas Qnr, 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*. (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Devido a esse fato, uma triagem para pesquisa de Beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) foi realizada no presente estudo.

2.7.2.3. Bombas de efluxo OqxAB e QepA

Em 2004 foi descoberto o gene plasmidial *oqxAB*, o qual codifica uma bomba de efluxo para multidrogas. Esse gene estava presente em um plasmídio que conferia resistência a um antibiótico, o Olaquinox, utilizado na agricultura e pecuária, e além dele, foi demonstrada certa resistência a quinolonas, com um aumento da CIM destas. Esse gene também foi encontrado no cromossomo de *K. pneumoniae* com diferentes níveis de expressão correlacionados a suscetibilidade a Olaquinox. Os estudos realizados envolvendo esse mecanismo consideram esse gene raro (STRAJILEVITZ *et al.*, 2009)

Outra bomba de efluxo de origem plasmidial está relacionada ao gene *qepA*, descoberto em 2002 no Japão. Ele é responsável por conferir resistência a múltiplos antimicrobianos e por aumentar a CIM das quinolonas (YAMANE *et al.*, 2007). Até hoje foram encontradas duas variantes do gene, a primeira *qepA1*, e a segunda *qepA2*, isolada na França (CATTOIR *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral: estabelecer padrões e possíveis mecanismos de resistência a quinolonas em cepas de *E. coli* uropatogênica com fenótipo lactose negativo da cidade de Ponta Grossa.

Objetivos específicos:

- Estabelecer, fenotipicamente, o perfil de resistência das cepas coletadas;
- Realizar um levantamento dos biótipos mais frequentes nessa população;
- Verificar se há relação entre os biótipos e os padrões de resistência;
- Analisar, nas cepas resistentes, as mutações em *gyrA* e *parC*;
- Investigar a presença dos genes plasmidiais *qnr* e *aac(6')-Ib-cr*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

Os meios de cultura utilizados foram: Ágar MacConkey, Base de Ágar Sangue e Ágar Mueller Hinton da BD® (Sparks, MD, EUA); Ágar Triptona de soja (TSA) e Caldo BHI da Himedia® (Mumbai, Índia). Todos foram preparados conforme indicado pelos fabricantes. Além deles foi usado o Kit para identificação de Enterobactérias e os discos de antimicrobianos da Newprov (Pinhais, PR, Brasil)

Os sais utilizados foram o 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), Exonuclease I da Biolabs (Ipswich, New England), Fosfatase Alcalina da USB (Cleveland, Ohio, EUA), BigDye da Applied Biosystems (Carlsbad, California, EUA)

4.2. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram: Balança semi-analítica BL 3200H da Shimadzu (Kyoto, Japan), Estufa Bacteriológica K316M4 e Balança Analítica Q500L 210C da Quimis (Diadema, SP, Brasil), 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, EUA).

4.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram analisadas 78 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina de pacientes com suspeita de infecção urinária de origem predominantemente comunitária. Essas amostras foram doadas pelos seguintes laboratórios da cidade de Ponta Grossa: Hospital Bom Jesus, Santa Casa de Misericórdia e Laboratório da Prefeitura durante o período de 2008 a 2010. Desse total de amostras, 58 foram incluídas no presente estudo por apresentarem fenótipo lactose negativo além de estarem livres de contaminantes. Na literatura não há dados referentes somente a *E. coli* lactose negativas, porém foi observado que na prática clínica elas se mostram mais resistentes e por isso foram escolhidas como objeto de estudo desse trabalho.

4.4. METODOLOGIAS

4.4.1. Armazenamento das amostras e Identificação

As cepas isoladas foram identificadas nos laboratórios de origem e então armazenadas em meio BHI acrescido de glicerol a 15% a -20°C. 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 aguardado o crescimento por 18 a 24 h a 37°C, possibilitando a avaliação da pureza das amostras e a revelação do teste da fermentação da lactose.

Colônias isoladas e confirmadas como lactose negativas foram encaminhadas para o teste de identificação utilizando provas bioquímicas convencionais através do Kit para Enterobactérias.. Este kit fornece leituras de doze provas bioquímicas clássicas e diferenciais entre as enterobactérias. Os resultados das provas foram agrupados de três em três, sendo que cada prova possui um valor numérico. A soma de cada grupo fornece ao final um número com quatro dígitos, que, em consulta ao manual para identificação de enterobactérias, propicia a classificação final com percentual de probabilidade e eventuais provas complementares para identificação segura do microrganismo em análise. Dessa forma foram definidos os biótipos de cada cepa de *E. coli* identificada.

Após a etapa de identificação, as cepas foram repicadas em meio TSA ou Base

de Ágar Sangue e incubadas por 18 a 24 h a 37°C para serem novamente armazenadas em BHI acrescido de glicerol a 15% a -20°C.

4.4.2. 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 h a 37°C. O teste foi realizado segundo o método de Kirby-Bauer, padronizado pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI) (CLSI, 2005). Os antimicrobianos selecionados da classe das quinolonas foram o Ácido Nalidíxico (Nal), Ciprofloxacina (Cip), Norfloxacin (Nor) e Ofloxacina (Ofx). Além dos antimicrobianos da classe das quinolonas, alguns β -lactâmicos também foram utilizados para a realização de triagem da enzima β -lactamase de Espectro Ampliado (ESBL), devido à relação existente entre os genes codificadores de ESBL e os genes plasmidiais de resistência a quinolonas. Portanto, foram testados os antimicrobianos beta-lactâmicos Amoxicilina com Ácido Clavulônico (Amc), Cefotaxima (Ctx), Ceftazidima (Caz) e Aztreonam (Atm) pelo método de disco aproximação a fim de se realizar uma triagem para ESBL (JARLIER *et al.*, 1988).

4.4.3. Amplificação dos genes pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Para a detecção dos genes relacionados à resistência a quinolonas, foi realizada a amplificação de parte destes genes pelo método de PCR Multiplex (SAMBROOK, 2001). Para isso, cada amostra foi repicada em meio MacConkey pelo método de esgotamento da alça, e foi aguardado o crescimento por 18 a 24 h a 37°C. A massa bacteriana foi retirada a partir de uma colônia isolada e colocada em um microtubo acrescido de 15 μ L de água MiliQ autoclavada. Esse sistema foi submetido a 95°C por 15 min., para permitir a quebra da parede celular e a liberação do DNA. Então, foi adicionada a mistura de reação para um volume final de 30 μ L, composta por: água MiliQ autoclavada, solução tamponante de reação 10X na concentração final de 1X, Cloreto de Magnésio 2,5 mM, *Taq* DNA polimerase na concentração de 0,025 U/ μ L, os quatro nucleotídeos dNTP a 0,2 mM e os oligonucleotídeos iniciadores a 0,2 μ M cada, com exceção do oligonucleotídeo iniciador parC a 0,4 μ M. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão relacionadas no Quadro 1.

Quadro 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o PCR Multiplex

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência	Tamanho Amplicon	Referência
GyrA F	AAA TCT GCC CGT GTC GTT GGT	344	Rodriguez-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-crR	CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT		
QnrS F	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA	417	Robicsek, 2006B
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 30 s., 55,4°C por 60 s. e 72°C por 60 s..

4.4.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados (10 µL) foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2% em 60 volts durante 2 horas de corrida em TAE (Tris 40 mM, Ácido Acético 20 mM, EDTA 1 mM). A visualização dos amplicons foi realizada sob luz ultravioleta (254 nm) após tratamento do gel com brometo de etídeo 0,5 µg/mL durante 30 minutos sob agitação seguidos de 5 min de tratamento com água sob agitação.

4.4.5. Tratamento enzimático

Após a realização da PCR, 20 µL do amplificado foram submetidos a tratamento com 0,5 µL de Exonuclease I a 20 U/µL e 1,0 µL de Fosfatase Alcalina (SAP) a 1 U/µL por 90min a 37°C. A inativação dessas enzimas foi realizada após 30 min a 80°C. As amostras purificadas foram conservadas a -20°C.

4.4.6. Sequenciamento

A fim de preparar as amostras para a PCR destinada ao sequenciamento, para um volume final de 10 μ L de reação, foi adicionado solução tamponante [Tris-HCL (pH 9) 80mM, Cloreto de Magnésio 2 mM] (3 μ L), BigDye (1 μ L), Oligonucleotídeo iniciador (0,5 μ L a 10 pmol/ μ L), DNA purificado (5 μ L) e 0,5 μ L de água MiliQ autoclavada. Em seguida, esse sistema foi submetido a PCR nas seguintes condições: um ciclo de 96°C por 2 min e 35 ciclos de 96°C por 45 s., 55,4°C por 30 s. e 60°C por 4 min.

Logo após, foi realizada a precipitação do DNA, adicionando aos 10 μ L do amplificado para sequenciamento: 2 μ L de acetato de amônio 7,5 M, 60 μ L de etanol absoluto e 10 μ L de água MiliQ autoclavada, seguido de centrifugação por 45 min. Logo após, foi descartado o sobrenadante e adicionado 150 μ L de etanol 70% e centrifugado por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA preparado para sequenciamento foi guardado seco a -20°C.

As amostras assim preparadas foram então enviadas para a Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica, e Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Bioquímica, onde foram obtidas as sequências dos fragmentos de DNA. Estas foram analisadas através do programa Bioedit e comparadas àquelas depositadas no *GenBank* (www.ncbi.nih.gov).

4.4.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5, utilizando o teste do Qui-quadrado, o Teste de Fisher e a prova corretiva de Yates. O valor “p” menor que 0,05 foi considerado como significativo para os testes aplicados.

5. RESULTADOS

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

CAPÍTULO I

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A QUINOLONAS EM *Escherichia coli*
UROPATOGÊNICA COM FENÓTIPO LACTOSE NEGATIVO NA CIDADE DE PONTA
GROSSA, BRASIL.

RESUMO

As infecções do trato urinário mostram uma elevada ocorrência na população, especialmente em mulheres, gestantes e idosos. O principal agente etiológico é a *E. coli*, principalmente nas infecções de origem comunitária. A terapia com antimicrobianos é realizada extensivamente com Quinolonas e o aparecimento de resistência é marcante e ascendente. Os principais mecanismos de resistência conhecidos em *E. coli* estão relacionados a mutações nas QRDR (Região Determinante de Resistência a Quinolonas) dos genes *gyrA* e *parC*, codificadores de subunidades das enzimas DNA Girase e Topoisomerase IV, respectivamente. Essas enzimas, que são os alvos de ação das Quinolonas, são responsáveis pelo superespiralamento e decatenação do DNA. Os genes plasmidiais que também estão envolvidos nos mecanismos de resistência são os *qnr* que codificam proteínas protetoras das enzimas alvo e o *aac(6')-Ib-cr*, que codifica uma enzima aminoglicosídeo acetiltransferase capaz de inativar a ciprofloxacina e norfloxacina. Neste trabalho foram analisadas 58 amostras de *E. coli* lactose negativas provenientes de urina, a fim de se traçar um perfil de resistência nessa população da região de Ponta Grossa e analisar os mecanismos de resistência envolvidos. Observou-se uma elevada taxa de resistência de 48%, dentre as quais 79% foram resistentes a todas as quinolonas testadas: ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina. Pode-se observar também uma relação direta entre os biótipos 971 e uma maior resistência e o biótipo 981 e uma maior sensibilidade, motivo pelo qual não seria recomendável o uso de Quinolonas para o tratamento de infecções causadas por *E. coli* biótipo 971. Pela análise molecular, para as amostras multirresistentes, foram encontradas mutações com substituição de aminoácido nos genes *gyrA* nos códons 83 e 87 e no gene *parC* uma única mutação, sendo essa no códon 80 para três cepas e no códon 84 para uma cepa. Mutações apenas no gene *gyrA* apareceram para amostras resistentes somente ao ácido nalidíxico. Esses dados estão de acordo com a teoria de que o acúmulo de mutações leva a um aumento da resistência às quinolonas. Os genes plasmidiais *qnr* e *aac(6')-Ib-cr* não foram encontrados.

Palavras-Chave: resistência, quinolonas, *Escherichia coli*, lactose negativo, biótipo

ABSTRACT

Urinary tract infections show a high incidence in the population, mainly in women, the elderly and pregnant women. The main etiological agent is *E. coli*, especially in Community infections. Antimicrobial therapy is performed extensively with the Quinolones and resistance emergence is striking and upward. It is known *E. coli* resistance mechanisms are related with QRDR (Quinolone Resistance Region Determining) mutations in *gyrA* and *parC* genes that are the drug targets. These genes encode respectively DNA Girase and Topoisomerase IV subunits responsible for DNA supercoiling and DNA decatenating. Another resistance mechanism that come from plasmids is *qnr* genes encoding a protein that can protect DNA girase and Topoisomerase IV. Another plasmidial gene is *aac(6')-Ib-cr* encoding an aminoglycoside acetyltransferase that can inactivate ciprofloxacin and norfloxacin. This study analyzed 58 *E. coli* lactose negative samples from urine, in order to draw a profile of resistance in this population from the region of Ponta Grossa and analyze the resistance mechanisms involved. There was a high resistance rate of 48%, among which 79% were resistant to all quinolones tested: nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin. There was also a direct relationship between the biotypes 971 and resistance in contrast to biotype 981 and sensitivity. Therefor Quinolones are not recommended in infection due to *E. coli* biotype 971. On molecular analysis on the multiresistant samples mutations with aminoacid substitution were found in three positions: the *gyrA* gene at codons 83 and 87 and in the *parC* gene at codon 80 in three strains and at codon 84 on a single strain. Mutations only at *gyrA* gene appeared for a sample resistant just to nalidixic acid. These facts are according to the theory of mutations accumulation causing increased resistance to quinolones. Plasmidial genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* were not found in these strains.

Keywords: bacterial resistance, quinolones, *Escherichia coli*, lactose negative, biotype

INTRODUÇÃO

Dentre as infecções causadas por bactérias, as Infecções do Trato Urinário (ITU) são uma das mais frequentes na população mundial, principalmente em mulheres, idosos, gestantes e indivíduos hospitalizados (FOXMAN *et al.*, 2002). Estudos apontam que 40 a 50% das mulheres adultas apresentam episódios dessa doença (HOOTON, 2000). O principal agente etiológico é a *Escherichia coli*, principalmente nas ITU comunitárias, isto é, não relacionadas a ambientes hospitalares (RONALD, 2003).

As quinolonas são um dos antimicrobianos mais utilizados na terapia das ITU nas últimas décadas, principalmente as Fluorquinolonas (FQ), como a Ciprofloxacina e Norfloxacin. Lançadas no mercado na década de 60, elas têm sido aprimoradas a fim de se obter um maior espectro de ação e uma melhor atividade (VAN BAMBEKE *et al.*, 2005). Sua ação consiste na inibição da DNA girase e Topoisomerase IV, as quais são responsáveis pelo superespiralamento e decatenação do DNA, resultando na morte celular. Ambas as enzimas são tetrâmeros formados por duas subunidades GyrA e GyrB para a DNA girase e ParC e ParE para a Topoisomerase IV. O alvo primário das quinolonas em Gram-negativos é a DNA girase e para as Gram-positivas a Topoisomerase IV (HOOPER, 2000).

Logo que o uso dessa classe de antimicrobianos foi difundido, apareceram relatos de cepas bacterianas resistentes. Um estudo com mulheres com cistite revelou índices de resistência ao Ácido Nalidíxico de 24,6% e à Ciprofloxacina de 10,8% no Brasil (SCHITO *et al.*, 2009). Na cidade de Ponta Grossa no ano de 2001, foi observada uma taxa de resistência de 11,6% para Norfloxacin em amostras comunitárias e 15,8% em hospitalares (BAIL, ITO, ESMERINO, 2006).

Os mecanismos de resistência até hoje conhecidos envolvem tanto genes cromossomais como plasmidiais. Quanto aos genes cromossomais, uma única mutação em determinadas regiões, as QRDR (Quinolone Resistance Determining Region), nos genes *gyrA* e *gyrB* da DNA girase e nos genes *parC* e *parE* da Topoisomerase IV levam à resistência ao Ácido Nalidíxico, enquanto que múltiplas mutações levam à resistência a todas as quinolonas. Para Gram-negativos, os códons 83 e 87 do gene *gyrA* são o principal sítio de mutação que confere resistência, seguidos pelos códons 78, 80 e 84 do gene *parC* (JACOBY, 2005). A diminuição da expressão de porinas, bem como o aumento de bombas de efluxo, que resultam numa

baixa concentração da droga dentro da célula bacteriana são outro caminho que leva não só à resistência a quinolonas como a outras classes de antimicrobianos (HOOPER, 2001). Diversos genes plasmidiais podem também estar envolvidos no mecanismo de resistência a quinolonas, porém sua ação isolada confere apenas um aumento na Concentração Inibitória Mínima (CIM) e necessitam da adição de um mecanismo cromossomal para conferir níveis elevados de resistência (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2003). Os genes *qnr* codificam uma proteína que tem um papel protetor das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV, diminuindo a ação das quinolonas. Já foram encontrados na última década quatro famílias desses genes, dos quais os genes *qnrA* e *qnrB* são os mais frequentemente encontrados e com maior número de variantes, enquanto que os genes *qnrC* e *qnrD* são mais raros (JACOBY *et al.*, 2008). Um outro gene plasmidial, o *aac(6')-Ib-cr* que codifica uma variante da enzima aminoglicosídeo acetiltransferase, está envolvido com a resistência especificamente a Ciprofloxacina e Norfloxacina, promovendo a inativação desses fármacos. (ROBICSEK *et al.*, 2006). Este gene tem aparecido em associação com outros genes plasmidiais de resistência a quinolonas, bem como com beta-lactamases como as Beta-Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL), principalmente em *E. coli*. (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Por fim, os genes plasmidiais *oqxA* e *qepA*, codificadores de bombas de efluxo, também estão envolvidos na resistência a quinolonas, embora com uma relevância menor em relação aos outros citados (STRAJILEVITZ *et al.*, 2009).

Assim, é de extrema importância o estudo da frequência de cepas resistentes a quinolonas e dos mecanismos de resistência existentes em nossa região, a fim de se ter ciência dos níveis de resistência e de se promover um uso mais racional destes antimicrobianos. Além disso, a partir desse estudo será possível avaliar se genes de resistência plasmidial, os quais são transferíveis horizontalmente, estão presentes ou em ascensão em nossa população.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Foram analisadas 58 cepas de *Escherichia coli* isoladas de urina de pacientes com suspeita de infecção urinária de origem predominantemente comunitária. Essas

amostras foram doadas pelos seguintes laboratórios da cidade de Ponta Grossa: Hospital Bom Jesus, Santa Casa de Misericórdia e Laboratório da Prefeitura durante o período de 2008 a 2010. Foram incluídas neste estudo apenas bactérias com fenótipo lactose negativo e livres de contaminantes. Na literatura não há dados referentes somente a *E. coli* lactose negativas, porém foi observado que na prática clínica elas se mostram mais resistentes e por isso foram escolhidas como objeto de estudo desse trabalho.

IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As cepas isoladas foram identificadas com o uso provas bioquímicas convencionais através do Kit para Enterobactérias. Este kit fornece leituras de doze provas bioquímicas clássicas e diferenciais entre as enterobactérias. Os resultados das provas são agrupados de três em três, sendo que cada prova possui um valor numérico. A soma de cada grupo fornece ao final um número com quatro dígitos, que, em consulta ao manual para identificação de enterobactérias, propicia a classificação final com percentual de probabilidade e eventuais provas complementares para identificação segura do microrganismo em análise. Dessa forma são definidos os biótipos de cada cepa de *E. coli* identificada. Após esta etapa de identificação, as cepas foram repicadas em meio TSA ou Base de Ágar Sangue e incubadas por 18 a 24 h a 37°C para serem armazenadas em BHI acrescido de glicerol a 15% a -20°C.

TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para a realização do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos, foi utilizado o método de Kirby-Bauer, padronizado pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI) (CLSI, 2005). Os antimicrobianos selecionados da classe das quinolonas foram o Ácido Nalidíxico (Nal), Ciprofloxacina (Cip), Norfloxacina (Nor) e Ofloxacina (Ofx). Além dos antimicrobianos da classe das quinolonas, alguns β -lactâmicos também foram utilizados para a realização de triagem da enzima β -lactamase de Espectro Ampliado (ESBL), devido à relação existente entre os genes codificadores de ESBL e os genes plasmidiais de resistência a quinolonas. Portanto, foram testados os antimicrobianos beta-lactâmicos Amoxicilina com Ácido Clavulônico (Amc), Cefotaxima (Ctx), Ceftazidima (Caz) e Aztreonam (Atm) pelo método de disco

aproximação a fim de se realizar uma triagem para ESBL (JARLIER *et al.*, 1988).

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

Para a detecção dos genes relacionados à resistência a quinolonas, foi realizada a amplificação de parte destes genes pelo método de PCR Multiplex (SAMBROOK, 2001). Para isso, cada amostra foi repicada em meio MacConkey pelo método de esgotamento da alça, e foi aguardado o crescimento por 18 a 24 h a 37°C. A massa bacteriana foi retirada a partir de uma colônia isolada e colocada em um microtubo acrescido de 15 µL de água MiliQ autoclavada. Esse sistema foi submetido a 95°C por 15 min., para permitir a quebra da parede celular e a liberação do DNA. Então, foi adicionada a mistura de reação para um volume final de 30 µL, composta por: água MiliQ autoclavada, solução tamponante de reação 10X na concentração final de 1X, Cloreto de Magnésio 2,5 mM, *Taq* DNA polimerase na concentração de 0,025 U/µL, os quatro nucleotídeos dNTP a 0,2 mM e os oligonucleotídeos iniciadores a 0,2 µM cada, com exceção do oligonucleotídeo iniciador ParC a 0,4 µM. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão relacionadas no Quadro 1.

Quadro 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o PCR Multiplex

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência	Tamanho Amplicon	Referência
GyrA F	AAA TCT GCC CGT GTC GTT GGT	344	Rodriguez-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-crR	CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT		
QnrS F	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA	417	Robicsek, 2006B
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 30 s., 55,4°C por 60 s. e 72°C por 60 s..

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos amplificados (10 µL) foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2% em 60 volts durante 2 horas de corrida em TAE (Tris 40 mM, Ácido Acético 20 mM, EDTA 1 mM). A visualização dos amplicons foi realizada sob luz ultravioleta (254 nm) após tratamento do gel com brometo de etídeo 0,5 µg/mL durante 30 minutos sob agitação seguidos de 5 min de tratamento com água sob agitação.

TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Após a realização da PCR, 20 µL do amplificado foram submetidos a tratamento com 0,5 µL de Exonucleasel a 20 U/µL e 1,0 µL de Fosfatase Alcalina (SAP) a 1 U/µL por 90min a 37°C. A inativação dessas enzimas foi realizada após 30 min a 80°C. As amostras purificadas foram conservadas a -20°C.

SEQUENCIAMENTO

A fim de preparar as amostras para a PCR destinada ao sequenciamento, para um volume final de 10 µL de reação, foi adicionado solução tamponante [Tris-HCL (pH 9) 80mM, Cloreto de Magnésio 2 mM] (3 µL), BigDye (1 µL), Oligonucleotídeo iniciador (0,5 µL a 10 pmol/µL), DNA purificado (5 µL) e 0,5 µL de água MiliQ autoclavada. Em seguida, esse sistema foi submetido a PCR nas seguintes condições: um ciclo de 96°C por 2 min e 35 ciclos de 96°C por 45 s., 55,4°C por 30 s. e 60°C por 4 min.

Logo após, foi realizada a precipitação do DNA, adicionando aos 10 µL do amplificado para sequenciamento: 2 µL de acetato de amônio 7,5 M, 60 µL de etanol absoluto e 10 µL de água MiliQ autoclavada, seguido de centrifugação por 45 min. Logo após, foi descartado o sobrenadante e adicionado 150 µL de etanol 70% e centrifugado por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA preparado para sequenciamento foi guardado seco a -20°C.

As amostras assim preparadas foram então enviadas para a Universidade

Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica, e Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Bioquímica, onde foram obtidas as sequências dos fragmentos de DNA. Estas foram analisadas através do programa Bioedit e comparadas àquelas depositadas no *GenBank* (www.ncbi.nih.gov).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5, utilizando o teste do Qui-quadrado, o Teste de Fisher e a prova corretiva de Yates. O valor “p” menor que 0,05 foi considerado como significativo para os testes aplicados.

RESULTADOS

Foram recolhidas 58 amostras de *E. coli* uropatogênica lactose negativas provenientes do município de Ponta Grossa. Conforme mostrado na Figura 5, das amostras com dados disponibilizados, 40 são do sexo feminino e nove do sexo masculino. A Figura 6 exhibe as faixas de idade em função do número de amostras, sendo que a mais expressiva é a de 21 a 40 anos, seguida pela de 41 a 60 anos.

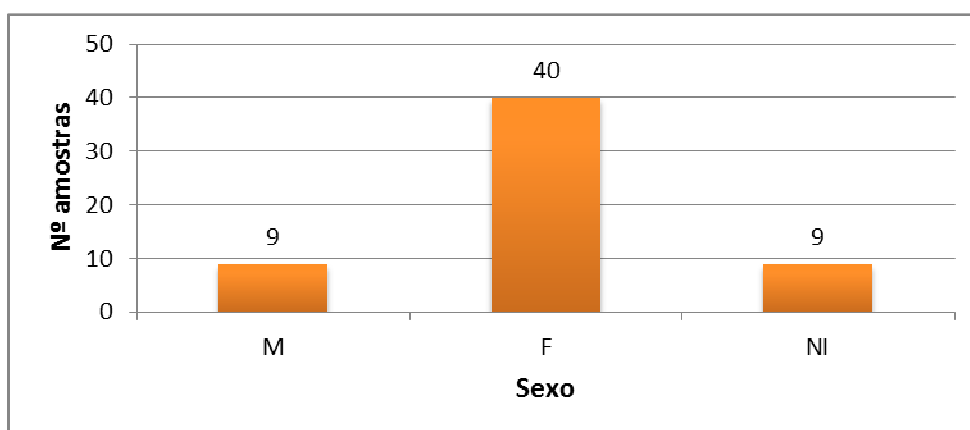


Figura 5: Distribuição das amostras quanto ao sexo. M=Masculino, F=Feminino, NI=Não Identificado. Conforme o esperado, a maioria das amostras provêm de indivíduos do sexo Feminino.

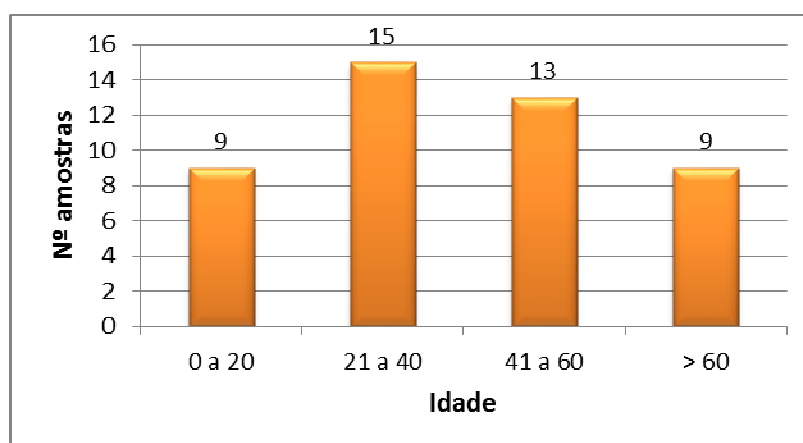


Figura 6: Distribuição das amostras quanto à faixa etária. A maior quantidade de amostras (15) se deu na faixa dos 21 aos 40 anos. No entanto, os idosos contribuíram com uma quantidade menor do que a esperada (9).

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, conforme mostra a Figura 7, revelou que 48% (28) amostras se mostraram resistentes a uma ou mais quinolonas e 52% (30) sensíveis. Nenhuma cepa foi positiva para o teste de triagem para ESBL. Dentre as resistentes, 79% (22) se apresentaram resistentes a todas as quinolonas, enquanto que 21% (6) apenas ao Ácido Nalidíxico.

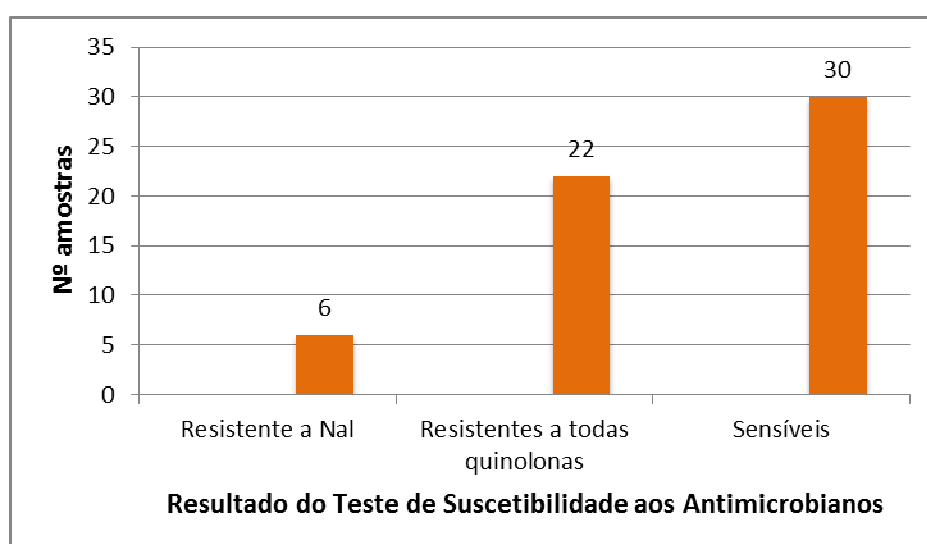


Figura 7: Perfil de Resistência às Quinolonas. Das 58 amostras, 30 mostraram-se sensíveis às quinolonas testadas e por outro lado, 22 foram resistentes a todas as quinolonas e seis mostraram-se resistentes apenas ao ácido nalidíxico. Das amostras resistentes, 79% apresentaram multirresistência a quinolonas.

Através da identificação por provas bioquímicas foi delineado o perfil de biótipos de *E. coli* encontrados nas amostras em estudo. Conforme exposto na Figura 8, o biótipo mais frequente é o 981, seguido pelo 971, o que significa que os dois biótipos mais frequentes diferem apenas pela capacidade de metabolização da ornitina e pela motilidade. Um dado interessante mostrado na Figura 9 é uma relação entre os biótipos mais frequentes e o perfil de resistência, onde no biótipo 971 (ornitina negativo e motilidade positivo) há um predomínio de cepas resistentes (12/13) e no 981 (ornitina positivo e motilidade negativo) há um predomínio de cepas sensíveis (10/14).

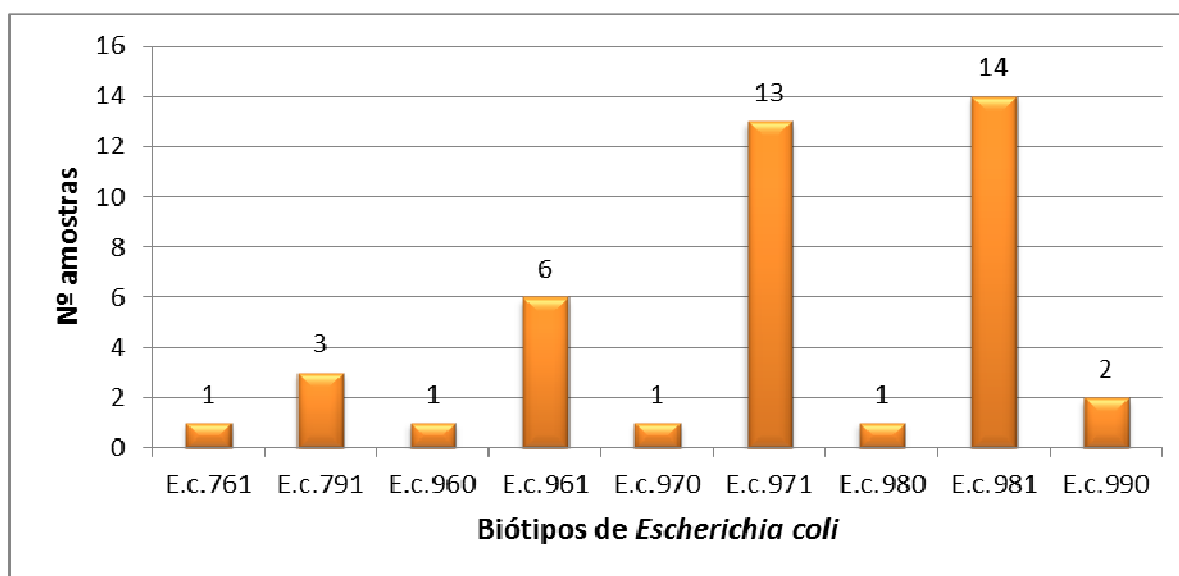


Figura 8: Perfil dos biótipos encontrados. E.c. 761=*E. coli* biótipo 761 e assim por diante. Os biótipos mais encontrados foram o 981 e o 971.

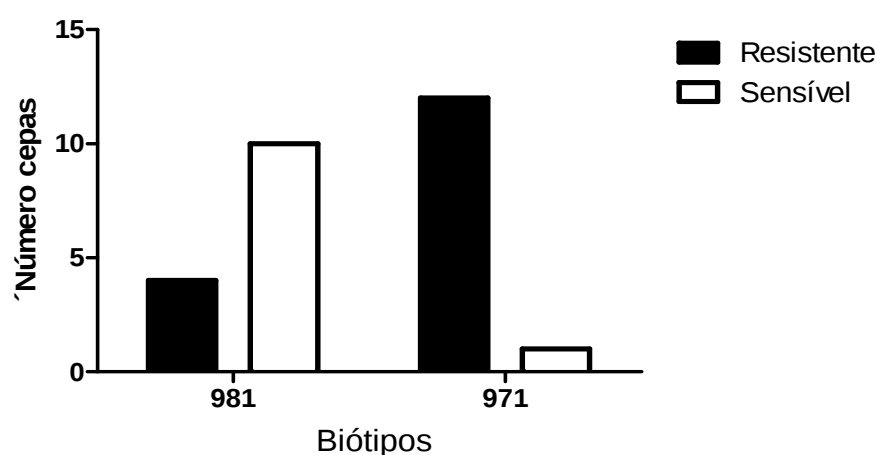


Figura 9: Relação dos Biótipos com a suscetibilidade a Quinolonas. Nota-se que para o biótipo 981 há um maior número de cepas sensíveis (branco) e para o Biótipo 971 um maior número de cepas resistentes (preto) ($p < 0,01$, Teste Qui-Quadrado).

A análise molecular foi realizada através das técnicas de PCR multiplex e sequenciamento das cepas resistentes. Uma amostra do grupo de cepas lactose negativas e sensível às quinolonas e β -lactâmicos, a GF63, foi utilizada como controle para comparação dos seus genes com os das demais resistentes. Após a etapa de PCR foi realizada a eletroforese em gel de agarose a fim de se confirmar a amplificação dos fragmentos dos genes envolvidos com a resistência e a sua qualidade. Os amplicons podem ser visualizados nas Figuras 10 a 12.

Na figura 10, uma cepa de *E.coli* com multirresistência a quinolonas e não pertencente a este trabalho foi utilizada para a padronização e controle dos experimentos. Nela a primeira banda está relacionada ao gene *aac(6')-lb-cr* com um amplicon esperado de 482 pares de bases (pb), a segunda banda refere-se a *gyrA*, com um amplicon esperado de 344 pb e a terceira, ao gene *parC*, com um amplicon esperado de 230 pb. Não foi possível a realização de um controle para os genes *qnr*, como seria o ideal. No entanto todos os cuidados foram tomados tanto em relação à escolha dos oligonucleotídeos iniciadores, para que fossem de fontes confiáveis, como o atendimento às especificações de seu uso durante a reação de PCR.

Atendendo às expectativas, todas as cepas apresentaram as bandas correspondentes a *gyrA* e *parC*, já que esses genes são constitutivos da bactéria. No entanto, as bandas que corresponderiam aos genes *qnr* e *aac(6')-lb-cr* não apareceram nas amostras em questão. As Figuras 11 e 12 mostram os amplicons de parte das cepas resistentes analisadas, as demais apresentaram o mesmo padrão no gel.

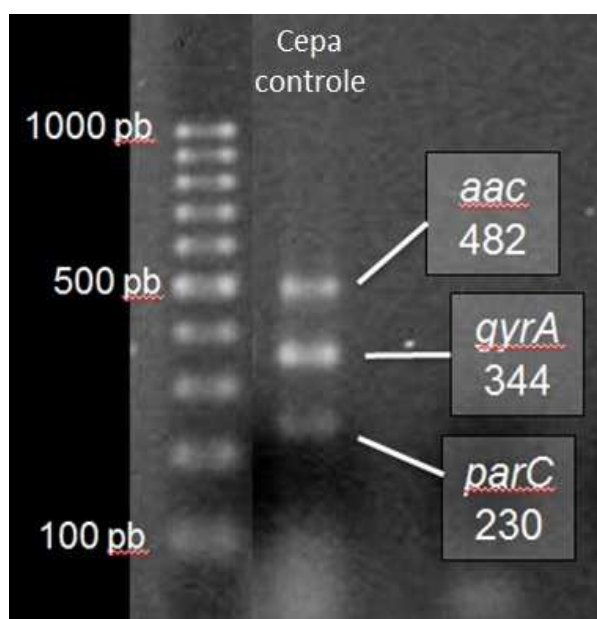


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose (2%) da cepa de *E.coli* utilizada para padronização e como controle da PCR multiplex. Aqui estão indicados os fragmentos dos genes *gyrA*, com um amplicon esperado de 344 pb, *parC* de 230 pb e *aac(6')-Ib-cr*, de 482 pb. Essa cepa provém de um isolado clínico identificado como *E. coli* resistente a todas as quinolonas. Os tamanhos dos amplicons foram retirados dos dados da literatura referente ao par de oligonucleotídeos iniciadores selecionado (ver Tabela 1).

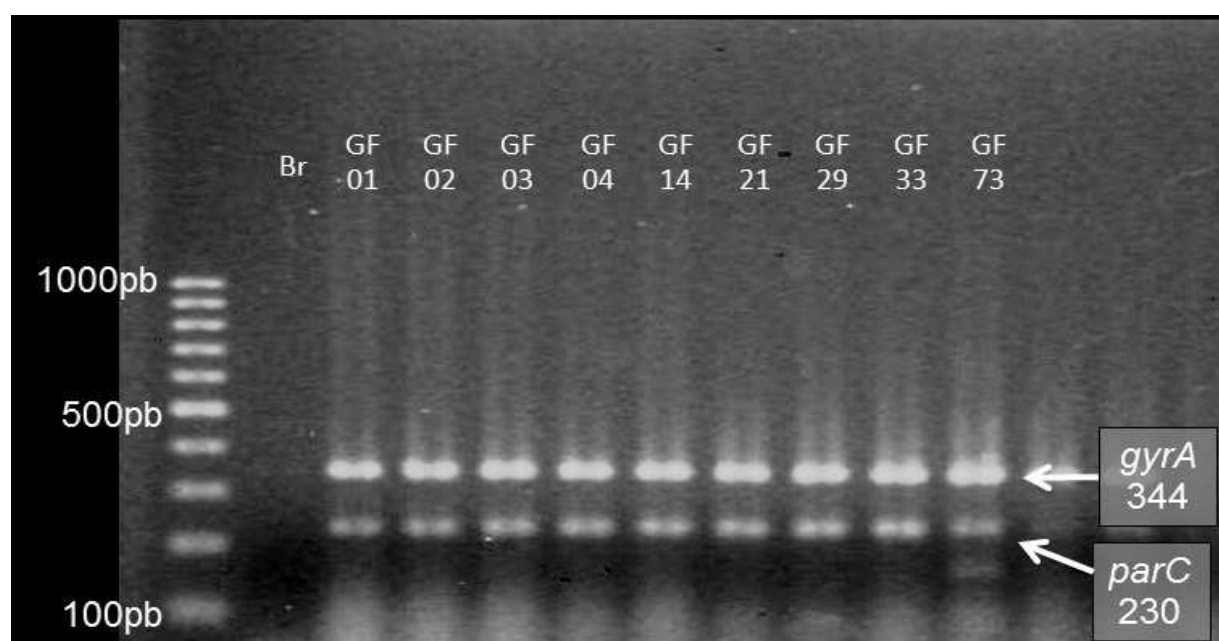


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose (2%) das amostras GF01 a GF73 resistentes a Quinolonas. Br=Branco , GF01 a GF73=amostras resistentes. O primeiro quadro aponta para o Branco, um controle, no qual não foi adicionado DNA molde. Os quadros apontam para os amplicons das amostras resistentes, correspondentes aos genes constitutivos *gyrA* com 344 pb e *parC* com 230 pb. Os tamanhos dos amplicons foram retirados dos dados da literatura referente ao par de oligonucleotídeos iniciadores selecionado (ver Quadro 1).

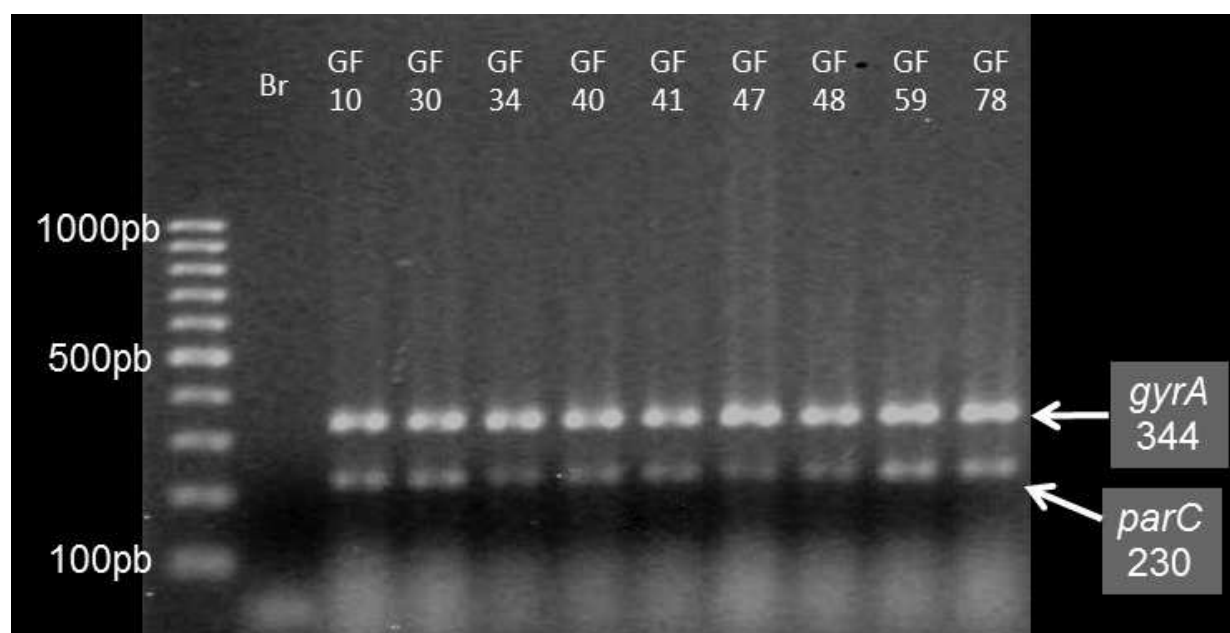


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose (2%) das amostras GF10 a GF78 resistentes a Quinolonas. Br=Branco , GF10 a GF78=amostras resistentes. O primeiro quadro aponta para o Branco, um controle, no qual não foi adicionado DNA molde. Os quadros apontam para os amplicons das amostras resistentes, correspondentes aos genes constitutivos *gyrA* com 344 pb e *parC* com 230 pb. Os tamanhos dos amplicons foram retirados dos dados da literatura referente ao par de oligonucleotídeos iniciadores selecionado (ver Quadro 1).

O sequenciamento foi realizado em algumas cepas selecionadas com base no fenótipo apresentado no teste de suscetibilidade a antimicrobianos. Assim, uma amostra sensível (GF63), duas resistentes somente ao Ácido Nalidíxico (GF34 e GF40) e quatro resistentes a todas as quinolonas (GF01, GF10, GF30 e GF54) foram sequenciadas.

Com o resultado do sequenciamento do gene *gyrA* pode-se realizar o alinhamento das sequências, o qual está demonstrado na Figura 13. A *E. coli* K12 substr. MG1655 foi utilizada como cepa padrão de expressão dos genes *gyrA* e *parC*. Em seguida está a cepa sensível GF63, utilizada como referência dentro do grupo de amostras estudadas, seguido pelas resistentes em ordem crescente de resistência. Destacam-se em algumas cepas mutações por substituição nos nucleotídeos 248 e 259, os quais provocam substituição de aminoácidos. Nas posições 453 e 468 (não mostradas na figura) também houve mutações, porém estas não retrataram mudança de aminoácidos. Ao se comparar a tradução das sequências, foram encontradas mudanças nos aminoácidos Ser83Leu para as amostras GF34, GF01, GF10, GF30 e GF54 e Asp87Asn para as amostras GF01, GF10, GF30 e GF54.

Nucleotídeo				248				259			
<i>gyrA</i>	K12	GGT	GAC	TCG	GCG	GTC	TAT	GAC	ACG	ATC	
GF63		---	---	---	---	--T	---	---	---	---	
GF34		---	---	T	---	--T	---	---	---	---	
GF40		---	---	---	---	--T	---	---	---	---	
GF01		---	---	T	---	--T	---	A	---	---	
GF10		---	---	T	---	--T	---	A	---	---	
GF30		---	---	T	---	--T	---	A	---	---	
GF54		---	---	T	---	--T	---	A	---	---	

Códon				83				87			
<i>gyrA</i>	K12	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Asp	Thr	Ile	
GF63		Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Asp	Thr	Ile	
GF34		Gly	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Asp	Thr	Ile	
GF40		Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Asp	Thr	Ile	
GF01		Gly	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Asn	Thr	Ile	
GF10		Gly	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Asn	Thr	Ile	
GF30		Gly	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Asn	Thr	Ile	
GF54		Gly	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Asn	Thr	Ile	

Figura 13: Alinhamento das sequências de DNA provenientes do gene *gyrA* (acima) e dos códons correspondentes (abaixo). A *E. coli* K12 substr. MG1655 foi utilizada como cepa padrão. Na segunda linha está a cepa sensível GF63, utilizada como referência dentro do grupo de amostras estudadas, seguido pelas resistentes em ordem crescente de resistência. Nas amostras GF01 a GF54 houve substituição de aminoácidos nos códons 83 e 87. Na GF34 houve apenas uma substituição no códon 83 e na amostra GF40 nenhuma substituição foi encontrada.

Da mesma forma para o gene *parC*, o amplicon sequenciado revelou mutações por substituição nos nucleotídeos 192, 198, 231, 237, 239, 240, 246, 250, 261, 276, 285 e 300. No entanto, somente as mutações nas posições 239 e 250, mostradas na Figura 14, reverteram-se em mutações nos aminoácidos da subunidade proteica. Após a análise da tradução das sequências, foram encontradas mudanças nos aminoácidos Ser239Ile para as amostras GF01, GF10 e GF30 e Glu250Lys para a amostra GF54.

Nucleotídeo				239				250			
<i>parC</i>	K12	GGC	GAT	AGC	GCC	TGT	TAT	GAA	GCG	ATG	
GF63		---	---	T	---	---	---	---	---	---	
GF34		---	---	T	---	---	---	---	---	---	
GF40		---	---	T	---	---	---	---	---	---	
GF01		---	--C	T	---	--C	---	---	---	---	
GF10		---	--C	T	---	--C	---	---	---	---	
GF30		---	--C	T	---	--C	---	---	---	---	
GF54		---	---		---	---	---	A	---	---	

Códon				80				84			
<i>parC</i>	K12	Gly	Asp	Ser	Ala	Cys	Tyr	Glu	Ala	Met	
GF63		Gly	Asp	Ser	Ala	Cys	Tyr	Glu	Ala	Met	
GF34		Gly	Asp	Ser	Ala	Cys	Tyr	Glu	Ala	Met	
GF40		Gly	Asp	Ser	Ala	Cys	Tyr	Glu	Ala	Met	
GF01		Gly	Asp	Ile	Ala	Cys	Tyr	Glu	Ala	Met	
GF10		Gly	Asp	Ile	Ala	Cys	Tyr	Glu	Ala	Met	
GF30		Gly	Asp	Ile	Ala	Cys	Tyr	Glu	Ala	Met	
GF54		Gly	Asp	Ser	Ala	Cys	Tyr	Lys	Ala	Met	

Figura 14: Alinhamento das sequências de DNA provenientes do gene *parC* (acima) e dos códons correspondentes (abaixo). A *E. coli* K12 substr. MG1655 foi utilizada como cepa padrão. Na segunda linha está a cepa sensível GF63, utilizada como referência dentro do grupo de amostras estudadas, seguido pelas resistentes em ordem crescente de resistência. Nas amostras GF01 a GF30 houve substituição de aminoácido no códon 80 e na GF34 houve substituição no códon 84.

O Quadro 2 mostra a relação entre os dados fenotípicos obtidos pelo Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos com os dados moleculares, obtidos através da análise do sequenciamento. Pode-se perceber que, com exceção da amostra GF40, existe uma correspondência entre o perfil fenotípico e molecular: quanto maior a resistência, maior é o número de mutações encontradas.

Quadro 2 : Relação do Perfil de Resistência e das mutações obtidas através do sequenciamento das QRDR

Amostra	Perfil Resistência				Aminoácido codificado			
	Nal	Cip	Nor	Ofx	Códons <i>gyrA</i>		Códons <i>parC</i>	
					83	87	80	84
GF63	S	S	S	S	Ser	Asp	Ser	Glu
GF34	R	S	S	S	Leu	Asp	Ser	Glu
GF40	R	S	S	S	Ser	Asp	Ser	Glu
GF01	R	R	R	R	Leu	Asn	Ile	Glu
GF10	R	R	R	R	Leu	Asn	Ile	Glu
GF30	R	R	R	R	Leu	Asn	Ile	Glu
GF54	R	R	R	R	Leu	Asn	Ser	Lys

Legenda: Nal=Ácido Nalidíxico, Cip=Ciprofloxacina, Nor=Norfloxacina, Ofx=Ofloxacina, S=Sensível, R=Resistente, Ser=Serina, Leu=Leucina, Asp=Aspartato, Asn=Asparagina, Ile=Isoleucina, Glu=Glutamina, Lys=Lisina

DISCUSSÃO

No presente estudo, as cepas isoladas e estudadas apresentaram alguns dados epidemiológicos esperados, como a predominância do sexo feminino em faixa de vida sexual ativa. Já a população idosa não foi tão expressiva, apesar de ser um alvo muito comum das infecções urinárias. Esse fato pode estar relacionado à dificuldade de muitos idosos em realizar ou ter acesso aos exames de confirmação do diagnóstico. Isso é um fator agravante das ITU nesse grupo e pode gerar muitas falhas terapêuticas ou a recorrência dessa doença.

Conforme apresentado anteriormente, o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos mostrou um grande número de amostras resistentes (48%), embora não se possa considerar esse valor com precisão devido ao fato de que algumas se perderam durante o tempo de estocagem ou apresentaram contaminação e foram descartadas. Mesmo assim, esse valor reflete um alto índice de infecção por bactérias resistentes na região de Ponta Grossa. Nesse sentido, a taxa de resistência pode variar muito de um local para outro e de um intervalo de tempo para outro. Um trabalho realizado em Curitiba, Brasil, no ano de 2002, mostrou uma taxa de resistência de 13,8%, considerando todas as quinolonas testadas (ITO *et al.*, 2008),

enquanto que outro estudo em Fortaleza, Brasil, entre os anos de 2007 e 2009 revelou uma taxa de 7,5% para Norfloxacin (ARAUJO *et al.*, 2011). Um estudo multicêntrico demonstrou a amplitude de índices de resistência para países da Europa, num mesmo intervalo de tempo, que vai desde 1,4% até 12,9% para Ciprofloxacina (SCHITO *et al.*, 2009), mostrando assim como as taxas podem variar de um local para outro. Na cidade de Ponta Grossa, em 2001, um trabalho envolvendo *E. coli* uropatogênicas de origem comunitária e hospitalar revelou uma taxa de resistência a Norfloxacin de 11,6% e 15,8%, respectivamente (BAIL, ITO, ESMERINO, 2006), a qual está bem abaixo desta encontrada em nossa avaliação que foi de 48%. Níveis de resistência tão altos quanto os aqui apresentados, ocorrem mais frequentemente em ambientes estritamente hospitalares, por exemplo, com taxas em torno de 31% para Ciprofloxacina (SANTO, *et al.*, 2006). Como as amostras deste trabalho são de origem predominantemente comunitária, um nível de resistência tão alto chama a atenção, principalmente por que o grupo em questão contempla apenas *E. coli* lactose negativas. Vale ressaltar que todos esses outros trabalhos acima citados envolvem tanto *E. coli* lactose positiva como lactose negativa, fato esse que reforça ainda mais a importância desses níveis de resistência apenas no grupo lactose negativo. Assim, quando houver o diagnóstico dessas bactérias no laboratório clínico, é importante a investigação quanto à resistência a quinolonas ou a não recomendação ou imediata suspensão do uso destas, visto que há essa grande população resistente em nossa região. No âmbito da pesquisa, é importante o estudo dessas amostras com investigações moleculares na tentativa de se analisar possíveis causas dessa elevada resistência nessas bactérias.

Durante o desenvolvimento desse trabalho, observou-se outro dado que chama a atenção. Trata-se da relação entre os biótipos e o perfil de suscetibilidade às quinolonas. Estudos, como o de Ferjani e colaboradores, Tunísia, 2011, mostram que há uma relação direta entre fatores de virulência, grupo filogenético da cepa e a suscetibilidade a fluorquinolonas. Alguns estudos brasileiros relacionam biótipos de *E. coli*, baseados na fermentação dos açúcares (sacarose, sorbitol, dulcitol, rafinose e ramnose), com fatores de virulência, relacionados aos genes *pap*, *afa*, *kps*, *cnf*, *fimH* e *hlyA*. Foi verificado que no biótipo 22 dessa classificação que apresenta padrão de fermentação do dulcitol e ausência de fermentação da rafinose, foram encontrados mais genes ligados aos fatores de virulência, tornando-as, portanto, mais virulentas (LE MOS *et al.*, 2011). Além disso, há trabalhos que revelam que em cepas

uropatogênicas e resistentes a quinolonas, há uma baixa expressão de fatores de virulência ou mesmo a sua inexistência no seu genoma (VILA *et al.*, 2002). Portanto, existem alguns trabalhos que já reportam essa relação entre o metabolismo bacteriano e os fatores de virulência e genes de resistência. Dentro de nossas cepas estudadas, o biótipo 981 apresenta a maioria das cepas sensíveis, caracterizado pela presença de baixa resistência. Por outro lado, o biótipo 971 está relacionado à maioria das amostras resistentes, inclusive a todas as quinolonas testadas, distinguindo-se pela presença de altos níveis de resistência. Conforme descrito anteriormente, a diferença desses biótipos reside na capacidade de utilização da ornitina e na presença de flagelos revelados pela prova da motilidade. As cepas resistentes em sua maioria não expressam a ornitina descarboxilase, reponsável pela metabolização da ornitina, porém apresentam flagelos, ao contrário das cepas sensíveis. Um possível mecanismo que poderia explicar essa relação é a mutação no códon 83 do gene *gyrA* como fator que diminuiria o superespiralamento do DNA, implicando em alterações na expressão dos fatores de virulência (SILVA e MENDONÇA, 2012). Estudos subsequentes necessitam ser feitos para uma tentativa de se elucidar o mecanismo que envolveria essas variações no metabolismo bacteriano com a resistência a quinolonas, podendo até mesmo haver relação com o que se propõe quanto à mudança conformacional da molécula de DNA provocada pela mutação do códon 83 no gene *gyrA*. No presente estudo, é dado um primeiro passo, com a investigação dos principais mecanismos de resistência nessas amostras, inclusive com a detecção de mutações no códon 83, que está exposto a seguir.

Dando seguimento à análise da resistência nesse grupo de *E. coli* uropatogênicas resistentes a quinolonas, através da técnica de PCR multiplex, foi possível rastrear os principais genes conhecidos envolvidos com a resistência a quinolonas: *gyrA*, *parC*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr*. Não foram encontrados genes de origem plasmidial nas amostras, apenas os genes constitutivos *gyrA* e *parC* (Figuras 11 e 12), embora não tenha sido possível a utilização de controles positivos para os genes *qnr*. No entanto, a seleção de oligonucleotídeos iniciadores foi criteriosa e as recomendações de uso destes foram cuidadosamente seguidas, a fim de se obter o máximo possível de êxito nos experimentos. Devido a esse controles virem por meio de doação de um grupo de pesquisadores dos Estados Unidos, não foi possível que fossem utilizados a tempo, porém, tão logo isso seja possível, serão inseridos nos testes realizados, assim como já foi realizado com o gene *aac(6')-Ib-cr*.

Mesmo assim, a ausência de genes plasmidiais poderia ser esperada, pois corrobora com a ausência de ESBL no teste fenotípico, visto que frequentemente os genes plasmidiais de resistência a quinolonas estão relacionados a plasmídios que abrigam genes codificadores de ESBL (CRÉMET *et al.*, 2011). Além disso, o grande número de amostras multirresistentes aponta para um mecanismo cromossomal, já que os plasmidiais em geral levam a apenas um aumento da CIM. Mesmo assim, apenas pelo fato de haver multiresistência não se pode afirmar com certeza que não há o acréscimo de plasmídios envolvidos no mecanismo. Uma outra hipótese para a não detecção de genes plasmidiais seria pela perda de plasmídios que poderia ocorrer, já que essas amostras estavam congeladas, passaram por algumas séries de congelamento e descongelamento durante os testes e estavam sem a pressão de seleção que seria a presença do antimicrobiano.

Dando continuidade às análises, foi preciso realizar o sequenciamento dos amplicons referentes a *gyrA* e *parC*. Vale observar que na amostra GF73 (Figura 11), há uma banda abaixo do *parC* que provavelmente deve-se a algum produto inespecífico formado durante o processo da PCR, visto que nenhum fragmento de DNA neste tamanho era esperado como produto.

A amostra GF63 (sensível a todas as quinolonas) foi utilizada como parâmetro de comparação para as demais e não houve substituição de aminoácidos, conforme o esperado, em relação à cepa K12 utilizada como padrão. No entanto, pode-se perceber ao longo do alinhamento realizado entre todas as sequências, que em alguns pontos existem diferenças de nucleotídeo entre a *E. coli* K12 e todas as amostras em estudo. Um exemplo disso ocorre na posição 255 do gene *gyrA*, onde para a cepa K12 há uma Citosina e para as demais há uma Timina (Figura 13). Essa substituição e nenhuma das outras dessa natureza que ocorreram ao longo das sequências, tanto de *gyrA* quanto de *parC*, causou mudança de aminoácidos e por estarem presentes em todas as amostras é possível que sejam características desse grupo específico de cepas.

Os fragmentos das amostras GF34 e GF40, resistentes apenas ao ácido nalidíxico, foram sequenciados e alinhados para comparação com os demais. Uma delas (GF34) apresentou uma única mutação no gene *gyrA* e nenhuma alteração no gene *parC*, comprovando o que já vem sido dito em estudos anteriores, nos quais se demonstra que uma única mutação, frequentemente com substituição no códon 83 ou 87 de *gyrA*, leva a resistência apenas ao ácido nalidíxico e sensibilidade às FQ

(KOMP LINDGREN *et al.*, 2003). No entanto, é importante ressaltar que clinicamente o uso das fluorquinolonas neste caso não é indicado, visto que, sob a pressão de seleção deste antimicrobiano, a chance de ocorrer uma mutação adicional é maior e poderia levar à resistência também às FQ durante o tratamento. Além disso, a CIM das FQ pode estar aumentada nesses casos, o que pode levar a uma falha terapêutica (RUIZ, *et al.*, 2002).

A outra cepa pertencente a esse mesmo grupo (GF40) não apresentou mutações nem em *gyrA*, nem em *parC*, no fragmento analisado. Assim, o seu perfil molecular mostra ser igual ao da cepa sensível. De acordo com Yoshida e cols., 1990, a QRDR do gene *gyrA* posiciona-se entre os códons 67 e 106 e mutações nestes códons, embora menos frequentes, também podem ser encontradas e estão relacionadas à resistência a quinolonas. As sequências obtidas dos fragmentos amplificados neste trabalho não incluíram o início da QRDR conforme o desejado, sendo que o códon 67 ficou excluído da análise. Assim, é possível que este seja o motivo pelo qual não foi encontrada uma mutação que explicasse o perfil de resistência da amostra GF40. Por outro lado, alguns estudos descrevem algumas regiões externas às QRDR, como aquela codificadora do códon 51, que sozinhas são capazes de gerar cepas resistentes ao ácido nalidíxico (FRIEDMAN *et al.*, 2001). Inclusive é proposta uma expansão da QRDR a fim de se incluir a região do códon 51 para as *E. coli*. Em outras espécies bacterianas como a *Salmonella enterica* também existe uma proposição de ampliação da QRDR a fim de se incluir o códon 44 que, embora em pequena proporção em relação aos demais alvos, também está envolvido no mecanismo de resistência a quinolonas (CAPOOR *et al.*, 2008). Mutações em outras regiões dos genes *parC*, bem como nos genes *gyrB* e *parE*, provavelmente não exercem um papel importante nesse caso, por serem alvos secundários. Outros mecanismos não explorados neste trabalho, como os que envolvem porinas e bombas de efluxo cromossomais, podem estar envolvidos no mecanismo de resistência dessa cepa e são necessários outros estudos para elucidar com clareza esse dado controverso.

Nas amostras resistentes a todas as quinolonas (GF01, GF10, GF30 e GF54) foram encontradas mutações em ambos os códons 83 e 87 de *gyrA*, além de uma mutação adicional em *parC* ou no códon 80 ou 84, conforme mostra as Figuras 13 e 14 e o Quadro 2, reforçando a teoria de que o acúmulo de mutações nas enzimas-alvo gera multirresistência às quinolonas e fluorquinolonas. Inúmeros estudos, conforme já

exposto anteriormente, têm mostrado os efeitos adicionais das mutações relacionados ao aumento da resistência a quinolonas e FQ (SÁENZ *et al.*, 2003; DE LA FUENTE *et al.*, 2007). Ao contrário da maioria dos dados da literatura, nosso trabalho não utiliza a CIM como parâmetro para a determinação do fenótipo da resistência, mas utiliza o halo dos discos. Muitos laboratórios usam esse método na sua rotina diária e por isso é importante demonstrar que existe uma relação entre as amostras resistentes pelo método de disco difusão e a comprovação do mecanismo em nível molecular, conforme mostra o Quadro 2.

Uma outra observação que pode ser feita reside no fato de haver várias mutações silenciosas, ou seja, que não resultaram na substituição de aminoácido, especialmente no fragmento amplificado do gene *parC*. Essas mutações podem tornar-se cumulativas ao longo do tempo nas células das próximas gerações e, em algum momento, podem resultar em substituições de aminoácidos e, se estes forem pontos-chave, passar a apresentar resistência às quinolonas ou reforçar ainda mais sua forma de defesa ante esses antimicrobianos.

De acordo com o acima exposto, pode-se dizer que os mecanismos de resistência envolvidos nesse grupo de *E. coli* uropatogênicas são predominantemente cromossomais, com mutações pontuais nos genes *gyrA* e *parC*, resultando na substituição de aminoácidos envolvidos diretamente na interação com as quinolonas e FQ, fato que está de acordo com os dados da literatura. Outros mecanismos, como os relacionados a bombas de efluxo e porinas também podem estar presentes e são objeto de estudos a serem realizados posteriormente.

6. CONCLUSÃO

1. As amostras apresentaram um índice de resistência elevado (48%) a quinolonas. Dentre estas, a maioria (79%) apresentou multirresistência a esses antimicrobianos..
2. Foi possível estabelecer uma relação direta entre o biótipo 971 e resistência e o biótipo 981 e sensibilidade a quinolonas.
3. Dentre os genes plasmidiais pesquisados, nenhum deles foi encontrado.
4. Uma das amostras sensíveis apenas ao ácido nalidíxico mostrou uma única mutação no gene *gyrA*, com substituição do aminoácido Serina por Leucina na posição 83, sendo esse o mecanismo já conhecido para esse perfil de resistência.
5. É possível que haja mutações dentro da QRDR de *gyrA*, mas que não foram sequenciadas em nosso estudo. Também é possível que haja mutações fora da QRDR e que podem afetar a suscetibilidade às quinolonas. Além disso, pode haver outros mecanismos envolvidos como aqueles relacionados a bombas de efluxo e porinas, não avaliados no presente estudo.
6. As amostras com perfil multirresistente apresentaram três pontos de mutações. Duas substituições ocorreram no gene *gyrA*, Ser83Leu e Asp87Asn e uma substituição ocorreu no gene *parC* Ser80Ile ou Glu84Lys. Esse resultado corrobora com a teoria de que o acúmulo de mutações aumenta a resistência às quinolonas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.C.; SIMOES, M.J.S.; RADDI, M.S.G. Ocorrência de infecção urinária em pacientes de um hospital universitário. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v.28, n.2, p.215-219, 2007.

ALÓS, J.I. Epidemiology and etiology of urinary tract infections in the community: Antimicrobial susceptibility of the main pathogens and clinical significance of resistance. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.23, Issue 4, p.3-8, 2005.

AKBARI-NAKHJAVANI, F. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections to fluorquinolones and detection of *gyrA* mutations in resistant strains. **Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, n.2, p. 94-99, 2007.

ARAÚJO, S.M.H.A., *et al.* Antimicrobial resistance of uropathogens in women with acute uncomplicated cystitis from primary care settings. **International Urology and Nephrology**, v.43, p. 461–466, 2011.

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

ARSLAM, H. *et al.* Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, Issue 5, p. 914-918, 2005.

BAIL, L.; ITO, C.A.S.; ESMERINO, L.A. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. **Revista brasileira de Análises Clínicas**. v.38, n.1, p. 51-56, 2006.

BLANCHE, *et al.* Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.40, p.2714-2720, 1996.

CAPOOR, M.R.; *et al.* Molecular analysis of high-level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi and *S. Paratyphi A*: need to expand the QRDR region?. **Epidemiology and Infection**, v.137, p. 871–878, 2008.

CATTOIR, V. *et al.* 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. *et al.* *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.

CHIDE, O.E.; ORISAKWE, O.E. Structural development, haematological immunological and pharmacological effects of quinolones. **Recent Patents Antiinfective Drug Discovery**, v.2, Issue 2, p.157-68, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement**. CLSI/NCCLS document M100-S15, 2005

COSTA, L.C. *et al.* Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.3, p. 175-180, 2010.

CRÉMET, L. *et al.* Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. **Pathologie Biologie**, v.59, n.3, p. 151–156, 2011.

DE LA FUENTE, C.M. *et al.* Mutaciones en genes *gyrA* y *gyrB* en cepas de bacilos Gram negativos aisladas en hospitales chilenos y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas. **Revista Médica de Chile**, v. 135, p. 1103-1110, 2007.

DRLICA, K. *et al.* Quinolones: Action and Resistance Updated. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.9, p. 981-998, 2009.

EVERETT, M.J. *et al.* Contributions of Individual Mechanisms to Fluoroquinolone Resistance in 36 *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans and Animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, n.10, p. 2380–2386, 1996.

FERJANI, S. *et al.* Virulence determinants, phylogenetic groups and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from cystitis and pyelonephritis. **Pathologie Biologie**, v.60, p. 270–274, 2011.

FOX, A. Bacteriologia: cultura e identificação de agentes infecciosos. In: _____. Microbiologia e Imunologia. Disponível em <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/chapter_2_bp.htm>. Acesso em: 10 mai. 2013.

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

FRIEDMAN, S.M.; LU, T.; DRLICA, K.. Mutation in the DNA gyrase A gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45,n.8, p.2378-2380, 2001.

HATA, M, *et al.* 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.

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**, v. 31, Issue S2, p. 24–28, 2000.

HOOPER, D. C. Emerging Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.2, p. 337–341, 2001.

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

HU, F. *et al.* 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, 2006.

ITO, C.A.S. *et al.* Quinolone-Resistant *Escherichia coli*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.1, p. 5-9, 2008.

JACOBY, G.A.. Mechanisms of Resistance to Quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, suppl. 2, p. S120-S126, 2005.

JACOBY, G.A., *et al.* *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, p. 1178–1182, 2006.

JACOBY, G.A., *et al.* *qnr* gene nomenclature. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n.7, p. 2297–2299, 2008.

JARLIER, V., *et al.* Extended broadspectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p. 867–878, 1988.

JIANG, Y. ;*et al.* 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 and Chemotherapy**, v.61, n.5, p.1003-1006, 2008.

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.

KATO, J. L.; SUZUKI, H.; IKEDA H. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p. 25676-25684, 1992.

KOMP LINDGREN, P.; KARLSSON, A.; HUGHES, D.. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, n.10, p.3222-3232, 2003.

KUNIN, C.M. Urinary tract infections in females. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18,

p. 1–12, 1994.

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.

LESCHER, G. Y. *et al.* 1,8 Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapy agents. **Journal of Medicinal and Phamaceutical Chemistry**, v.5, p. 1063-1068, 1962.

LOPES, A.A. *et al.*. Aumento da frequência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas Revista da Associação Médica Brasileira, v.44, n.3, p. 196-200, 1998.

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

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

MARTINEZ-MARTINEZ, L *et al.*. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**, v.51, p. 1037-1039, 2003.

MC DONALD, C.L., *et al.*. Emergence of Reduced Susceptibility and Resistance to Fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and Contributions of Distinct Selective Pressures. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.45, n.11, p. 3084–3091, 2001.

MULLER, E.V. *et al.* Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas da Universidade Paranaense – Umuarama – PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.40, n.1, p. 35-37, 2008.

OELSCHLAEGE, T.A.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.. Virulence factors of uropathogens. **Current Opinion in Urology**, v.12, p.33-38, 2002.

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

PALLECHI, L. *et al.*. Quinolone Resistance in Absence of Selective Pressure: The Experience of a Very Remote Community in the Amazon Forest. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.6, n.8, p. 1-7, 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, 1997A.

PATTERSON, T. F., ANDRIOLE, V.T. Bacterial urinary tract infections in diabetes. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.11, p. 735–750, 1997B.

RIOS, E. *et al.*. 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, 2007.

ROBICSEK, A., *et al.*. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. **Nature Medicine**, v.12, p. 83–88, 2006.

ROBICSEK, A. *et al.*. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p. 2872-2874, 2006.

ROCHA, D.P. *et al.*. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v.34, n.1, p. 111-118, 2011.

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-MARTÍNEZ, J. M. *et al.* Plasmid mediated quinolone resistance: an update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.17, p. 149–182, 2011.

RONALD, A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. **Disease a Month**, v.49, Issue 2, p.71-82, 2003.

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

RUIZ, J. *et al.*. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.42, p. 257–261, 2002.

SADER, H.S. *et al.*. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.1, p. 25-79, 2004.

SAÉNZ, Y. *et al.*. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 1001–1005, 2003.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W.. In vitro amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. In _____ **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed., Cold Spring Harbor, 2001, p.26-50.

SANTO, E. ; SALVADOR, M.M.; MARIN, J.M.. Antimicrobial resistance among urinary tract *Escherichia coli* isolates from inpatients and outpatients in a tertiary care center in Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.11, n.6, p. 558-559, 2006.

SCHITO, G. C., *et al.* The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections.

International Journal of Antimicrobial Agents, v.34, p. 407–413, 2009.

SILVA, G.J.da; MENDONÇA, N.. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v.3, n.1, p. 18–28, 2012.

SMITH, A. *et al.* **Fluoroquinolones: place in ocular therapy**. *Drugs*, v. 61, p. 747–761, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA e SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. **Infecções do trato urinário não complicadas: tratamento**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, Brasília, 2004. 11p. (Projeto Diretrizes).

STRAHILEVITZ, J. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.4, p.664-689, 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.

THOMSON, K.S., SANDERS, W. E., SANDERS, C. C. USA resistance patterns among UTI pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.33, Suppl A, p. 9-15, 1994.

VAN BAMBEKE *et al.* Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p. 256-280, 2005.

VILA, J. *et al.* Are Quinolone-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Less Virulent? **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p. 1039–1042, 2002.

WANG, M. *et al.* New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p.1892–1897, 2009.

WILES, T.J.; Richard R. KULESUS, R.R.; MULVEY, M.A. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, v.85, n.1, p. 11-19, 2008.

WILLMOTT, C.J.R., MAXWELL, A.. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces the binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p.126-127, 1993.

WINN Jr. W. *et al.* The Enterobacteriaceae. In: Winn Jr W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenber P, Woods G. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2006. p. 211-302.

YAMANE, K., *et al.* New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p. 3354–3360, 2007.

YOSHIDA, H., *et al.* Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA*

gene of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.34, p. 1271–1272, 1990.

YOSHIDA, H., *et al.*. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, n. 8, p. 1647–1650, 1991.