



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JULIANA BUCK DIAS

**CARACTERIZAÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE  
ESPECTRO ESTENDIDO EM ENTEROBACTÉRIAS,  
ISOLADAS DE URINA, DE PACIENTES DA COMUNIDADE,  
NO MUNICÍPIO DE LONDRINA**

---

Londrina  
2018

JULIANA BUCK DIAS

**CARACTERIZAÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE  
ESPECTRO ESTENDIDO EM ENTEROBACTÉRIAS,  
ISOLADAS DE URINA, DE PACIENTES DA COMUNIDADE,  
NO MUNICÍPIO DE LONDRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero

Londrina  
2018

JULIANA BUCK DIAS

**CARACTERIZAÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO  
ESTENDIDO EM ENTEROBACTÉRIAS, ISOLADAS DE URINA, DE  
PACIENTES DA COMUNIDADE, NO MUNICÍPIO DE LONDRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marcia Regina Eches Perugini  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof Dra. Renata Katsuko Takayama  
Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de Abril de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, por ter me concedido saúde, força e disposição para finalizar todo este projeto.

Agradeço à minha orientadora, Eliana Carolina Vespero, pelos textos, orientação e amizade. Obrigada por seu grande desprendimento em me ensinar e tornar tudo possível.

Agradeço aos docentes do Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial pelos ensinamentos

Agradeço os parceiros e amigos do laboratório de microbiologia pela compreensão, carinho e ajuda durante todo o projeto, principalmente a Evelyn Poliana, muito obrigada.

Agradeço à Dra. Zuleica Tano, pelo incentivo e grande contribuição para a realização deste trabalho.

Agradeço à equipe de colaboradores do Laboratório de Microbiologia do Centrolab, pela ajuda na coleta das amostras.

Agradeço aos meus pais Edson e Vanilde, que me proporcionaram oportunidades para me dedicar profissionalmente. Meus irmãos e sobrinha, que deram apoio e incentivo nas horas difíceis. Sou grata também a todos meus familiares, que compreenderam minha ausência pelo tempo dedicado aos estudos e que de alguma forma também contribuíram para a realização da minha jornada acadêmica.

Agradeço ao meu futuro esposo Rafael Angeli, que além de me fazer feliz, teve muita paciência e me ajudou durante todo o percurso da minha vida acadêmica. Obrigada pelo companheirismo e amor, esta conquista é nossa.

Agradeço à minha avó, Diolanda (*In Memoriam*), que será sempre minha maior fonte de inspiração e força.

DIAS, Juliana Buck. **Caracterização de beta-lactamases de espectro estendido em enterobactérias, isoladas de urina, de pacientes da comunidade, no município de Londrina.** 2018. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

## RESUMO

A prevalência dos uropatógenos nas infecções do trato urinário (ITU) isoladas, na comunidade e seu perfil de susceptibilidade são essenciais na determinação da terapia empírica apropriada. No entanto, dados epidemiológicos dessas infecções na comunidade ainda são limitados. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as  $\beta$ -Lactamases de espectro estendido (ESBL) de enterobactérias isoladas de uroculturas, de pacientes das Unidades Básicas de Saúde e Unidades de Prontos Atendimentos de Londrina, realizadas pelo Laboratório Central (CentroLab) da Prefeitura de Londrina-Paraná, no período de junho 2016 a maio 2017. De 56.555 uroculturas realizadas, 8.275 (14,6%) foram positivas pelo sistema automatizado Vitek<sup>®</sup>2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), sendo que 7.189 (86,9%) microrganismos foram da família *Enterobacteriaceae*, destes 488 (6,7%) foram produtores de ESBL. Os microrganismos mais frequentes foram *Escherichia coli*, sendo isolados em 5.761 (69,8%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* com 688 (8,3%) e *Proteus mirabilis* com 334 (4,0%). Em que 329 (5,7%) isolados de *E.coli* e 159 (24,2%) isolados de *K. pneumoniae* foram produtores de ESBL. Dos isolados de ESBL, 368 (75,3%) eram amostras de mulheres, das quais 270 (55,3%) tinham mais de 65 anos. A idade e sexo feminino foram fatores de risco para aquisição de ITU por *E.coli* e/ou *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Foi realizado teste confirmatório para ESBL em ágar ChromID<sup>®</sup> ESBL e Duplo Disco Sinergismo (DDS). Das 329 amostras de *E.coli*, o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> foi encontrado em 275 isolados, individualmente ou em associações, os quais predominaram os grupos *bla*<sub>CTX-M1</sub> em 179 (54,4%) dos isolados, seguido de *bla*<sub>CTX-M9</sub> em 81 (24,6%). Os genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> ocorreram em 94 (28,5%) e 81 (24,6%) isolados, respectivamente. Dentre os 159 isolados de *K. pneumoniae* foram detectados gene *bla* em 141 (88,6%) dos isolados, em que 27 (16,9%) dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL apresentavam os três genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>, simultaneamente. O gene *bla*<sub>CTX-M</sub> foi predominante, esteve presente em 132 (83,0%) dos isolados, em que *bla*<sub>CTX-M1</sub> apresentou prevalência de 90 (56,6%), enquanto que *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> foram detectados em 58 (36,4%) e 37 (23,2%) dos isolados, respectivamente. Este estudo descreveu a prevalência de ESBL entre isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* em uroculturas na comunidade. Demonstrando, assim, a necessidade de estabelecer sistemas de monitoramento locais e nacionais da resistência antimicrobiana no Brasil para fornecer dados às diretrizes de tratamento de ITU na comunidade.

**Palavras-chaves:** Infecções urinárias. Infecções comunitárias adquiridas. *Enterobacteriaceae*.  $\beta$ -lactamases.

DIAS, Juliana Buck. **Characterization of spectrum beta-lactamases extended in enterobacteria, isolated from urine, of community patients, in the municipality of Londrina.** 2018. 55 p. Dissertation (Masters in Clinical and Laboratory Physiopathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

The prevalence of uropathogens in community-specific urinary tract infections (UTIs) and their susceptibility profile are essential in determining appropriate empirical therapy. However, epidemiological data on these infections in the community are still limited. The objective of this work was to characterize extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) of enterobacteria isolated from urocultures, from patients from the Basic Health Units and Units of Ready-to-Use Services of Londrina, performed by the Central Laboratory (CentroLab) of the Londrina-Paraná City Hall, from June 2016 to May 2017. Of the 56,555 urocultures carried out, 8,275 (14.6%) were positive by automated system Vitek<sup>®</sup> 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), with 7,189 (86.9%) microorganisms were from the *Enterobacteriaceae* family, of which 488 (6.7%) were ESBL producers. The most frequent microorganisms were *Escherichia coli*, being isolated in 5,761 (69.8%), followed by *Klebsiella pneumoniae* with 688 (8.3%) and *Proteus mirabilis* with 334 (4.0%). In that 329 (5.7%) isolates of *E. coli* and 159 (24.2%) isolates of *K. pneumoniae* were ESBL producers. Of the ESBL isolates, 368 (75.3%) were female samples, of which 270 (55.3%) were over 65 years old. Age and female sex were risk factors for acquisition of UTI by *E. coli* and / or *K. pneumoniae* producing ESBL. Confirmatory test was performed for ESBL on ChromID<sup>®</sup> ESBL agar and Double Disc Synergism (DDS). Of the 329 *E. coli* samples, the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was found in 275 isolates, individually or in associations, which predominated the *bla*<sub>CTX-M1</sub> groups in 179 (54.4%) of the isolates, followed by *bla*<sub>CTX-M9</sub> in 81 (24.6%). The *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes occurred in 94 (28.5%) and 81 (24.6%) isolates, respectively. Among the 159 isolates of *K. pneumoniae*, *bla* gene was detected in 141 (88.6%) of the isolates, in which 27 (16.9%) of ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates showed the three *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub>, simultaneously. The *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was predominant, was present in 132 (83.0%) of the isolates, in which *bla*<sub>CTX-M1</sub> presented a prevalence of 90 (56.6%), while *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> were detected in 58 (36.4%) and 37 (23.2%) of the isolates, respectively. This study described the prevalence of ESBL among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates in urocultures in the community. Thus demonstrating the need to establish local and national antimicrobial resistance monitoring systems in Brazil to provide data to the guidelines for treatment of UTI in the community.

**Key-words:** Urinary Tract Infections. Community-Acquired Infections. *Enterobacteriaceae*.  $\beta$ - lactamases.

## LISTA ABREVIATURAS

AST	Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamase
ITU	Infecção do Trato Urinário
PCR	Polymerase Chain Reaction
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitros
UPEC	Uropathogenic Escherichia coli

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1	INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO.....	10
1.2	UROPATÓGENOS.....	11
1.3	FATORES PREDISPONETES PARA AQUISIÇÃO DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO .....	12
1.4	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	15
1.5	BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	22
3.1	AMOSTRAS E TESTE DE SENSIBILIDADE.....	22
3.2	COLETA DE DADOS.....	23
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS $\beta$ -LACTAMASES .....	23
3.3.1	Testes Fenotípicos .....	23
3.3.1.1	<i>Teste de Duplo Disco Sinergismo (DDS)</i> .....	23
3.3.1.2	<i>Teste em Ágar ChromID<sup>®</sup> ESBL</i> .....	23
3.3.2	Testes Genotípicos.....	23
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
	<b>ARTIGO 1</b>	
	Characterization of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteria in Community-Acquired Urinary Tract Infections, in Brazil	
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

## **ANEXOS**

ANEXO I – Normas de formatação do periódico <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i> .....	48
ANEXO II – Figura 1 .....	54
ANEXO III – Tabela de distribuição do gene <i>bla</i> .....	55

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

As infecções de trato urinário (ITU) estão entre as infecções bacterianas mais comuns na comunidade como no ambiente hospitalar (FASUGBA et al., 2015), atrás apenas das infecções do trato respiratório (MORAES et al., 2014; QUEIROZ; FELICIO, 2010).

Aproximadamente 150 a 250 milhões de pessoas por ano são acometidas por um episódio de ITU (ZOWAWI et al., 2015). Apenas nos Estados Unidos, no ano de 2007, houve aproximadamente 10,5 milhões de pacientes ambulatoriais com sintomas relacionados às ITU (FLORES-MIRELES et al., 2015). Na França a ITU é a infecção mais frequentemente adquirida na comunidade, com uma incidência estimada em 625.000 casos de pacientes por ano (FOXMAN, 2014). No Brasil, de acordo com dados da ANVISA (2008), estima-se que cerca de 10 a 20% das mulheres apresentam, pelo menos, uma ITU em algum momento da vida, com prevalência de aproximadamente 1 a 3% em mulheres jovens não grávidas. Quando se trata de lactentes de até 6 meses, a incidência é de 2 casos por 1.000 nascidos vivos (ANVISA, 2008).

A ITU é um processo inflamatório que ocorre devido à presença de algum microrganismo que é capaz de invadir, multiplicar-se e causar lesão, em qualquer parte do trato urinário (TURPEN, 2018; NAJAR; SALDANHA; BANDAY, 2010). É uma patologia que acomete indivíduos de ambos os sexos em todas as faixas etárias, entretanto apresenta a prevalência geral em mulheres (3,5%), com aumento em mulheres sexualmente ativas (TAN; CHLEBI, 2016; FOXMAN, 2014).

Conhecer a localização da infecção, além da sintomatologia e a frequência que o paciente apresenta ITU é importante para que possa ser realizada a classificação da doença e o seu correto tratamento. As ITU podem ser classificadas de acordo com o local anatômico ou gravidade. As ITU baixas são caracterizadas pela cistite, uretrite e prostatite, enquanto que a ITU alta é representada pela pielonefrite, em que há comprometimento dos rins. A

infecção urinária baixa ou cistite pode ser ou não sintomática (COSTA et al., 2010, HOOTON, 2012). Clinicamente, a classificação das ITU compreende casos não complicados ou complicados, dependendo da presença de anormalidades estruturais ou neurológicas do trato urinário, como causas obstrutivas, anátomo-funcionais, metabólicas, bexiga neurogênica e emprego de qualquer tipo de instrumentação (FLORES et al., 2015; GUPTA; ORREGO-MARIN; HENAO-MEJIA and CARDONA-ARIAS, 2014; TRAUTNER, 2013).

A apresentação clínica da ITU pode incluir algumas variáveis, como: disúria, polaciúria, urgência miccional, incontinência urinária, hematúria, febre, dor suprapúbica, náuseas, vômitos e mal-estar. Uma vez que alguns sintomas urinários são considerados ambíguos, como a disúria, polaciúria e urgência miccional, pois não são causas exclusivas da ITU, o diagnóstico é complicado. Entre homens e mulheres, a prevalência de bacteriúria assintomática aumenta com a idade (FOXMAN, 2014).

Além disso, quando um paciente tem suspeita de ITU associada com febre e dor de flanco, há uma maior probabilidade de ser pielonefrite (FOXMAN, 2014; TURPEN, 2018). A pielonefrite é menos comum comparada a cistite. Estima-se que ocorra com maior frequência em mulheres, de 3 a 4 casos por 10.000 mulheres, em oposição a 1 a 2 casos por 10.000 homens na população ambulatorial (CZAJA et al., 2012; TURPEN, 2018)

## 1.2 UROPATÓGENOS

Os microrganismos mais frequentemente envolvidos na ITU incluem bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Contudo o agente casual mais frequente é a *E. coli*, principalmente nas ITU ambulatoriais, mas também é responsável por uma grande porcentagem de infecções urinárias em pacientes hospitalizados (FOXMAN, 2014). *E. coli* representam cerca de 80% a 90% das ITU sem complicações adquiridas na comunidade, principalmente em mulheres com menos de 50 anos de idade (MINARDI et al., 2011; WAGENLEHNER et al., 2008). As cepas de *E. coli* que são responsáveis pelas ITU são denominadas *E. coli* uropatogênicas (UPEC). As UPEC possuem diversos fatores de virulência, como fimbrias, pili, curli, flagelos e outras substâncias secretadas, como toxinas, sistemas de aquisição de ferro, os quais

contribuem com a capacidade do microrganismo de aderir à célula do epitélio e colonizar o trato urinário do hospedeiro, contribuindo para a patogenicidade do microrganismo (TERLIZZI et al., 2017).

Além de *E. coli*, diversos estudos demonstram que as bactérias prevalentes causadoras de ITU são relativamente diversificadas, microrganismos como *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* do grupo B e D, *Enterococcus faecalis* podem estar envolvidas. Entretanto, os bacilos gram negativos do grupo das *Enterobacteriaceae* são os mais frequentes, participando com cerca de 90% dos casos relatados (SORLOZANO et al., 2014). Nas ITU não complicadas, os bacilos gram negativos são isolados em 75 a 95% das culturas, enquanto nas complicadas, em 25 a 45% das culturas (HOOTON, 2012).

A ocorrência de patógenos causadores de ITU varia geograficamente, e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos requer monitoramento a fim de fornecer informações para orientação terapêutica, especialmente em relação à terapia antimicrobiana empírica (MORAES et al., 2014).

### 1.3 FATORES PREDISPOANTES PARA AQUISIÇÃO DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

A ITU é uma patologia extremamente frequente, que ocorre em todas as idades, do neonato ao idoso. (HEILBERG; SCHOR, 2003, FOXMAN, 2014). Durante o primeiro ano de vida há predomínio no sexo masculino, devido ao maior número de malformações congênitas. Na infância e na vida adulta, o sexo feminino é mais acometido, principalmente na fase sexualmente ativa. Já a partir da quinta e sexta década de vida o contexto se modifica, quando o prostatismo torna o homem mais suscetível à ITU (HEILBERG; SCHOR, 2003, TERLIZZI et al 2017).

A prevalência de ITU nas mulheres ocorre por alguns fatores, como a fisiologia, já que na mulher a uretra é mais curta, além da proximidade do canal vaginal ao ânus; gravidez, visto que as mudanças anatômicas, fisiológicas e hormonais da gestação, como modificação da posição da bexiga, aumento do débito urinário, além de alcalinização urinária contribuem para a estase urinária

e proliferação bacteriana, o que favorece a ocorrência de infecções do trato urinário. (VAN BRUMMEN et al., 2006, TERLIZZI et al., 2017)

Outras populações com risco de ITU incluem idosos, pacientes com tumores, urolitíase, estenose de junção uretero-piélica, bexiga neurogênica, refluxo vesico-ureteral, rim-espongiomedular, nefrocalcinose, cistos renais, divertículos vesicais, insuficiência renal, diabetes mellitus, transplante renal, hipertrofia benigna de próstata e pacientes em uso de catéter de demora ou qualquer tipo de instrumentação (FOXMAN, 2002; HEILBERG; SCHOR, 2003; FOXMAN, 2014; TERLIZZI et al., 2017).

A sonda vesical de demora tem sido associada com um aumento do risco de ITU, incluindo infecções causadas por bactérias resistentes, como bactérias produtores de ESBL (*Extended-spectrum beta-lactamase*) e resistentes aos carbapenêmicos (RODRIGUEZ-BANO et al., 2008; SHILO et al., 2013).

A infecção urinária é muito comum na população idosa e pode apresentar-se como ITU assintomática ou sintomática. A maioria das ITU em idosos são complicadas e estão associadas a fatores predisponentes no trato urinário. Além disso, há evidência de menor prevalência de ITU nos pacientes idosos que vivem em suas próprias casas, comparados àqueles que passam longos períodos em casa de repouso (FIORE; FOX, 2014).

Devido aos fatores predisponentes, alguns pacientes apresentam problemas recorrentes de ITU. As ITU recorrentes são definidas por três ou mais episódios de ITU, em até 12 meses, bem como duas ou mais recorrências dentro de 6 meses. As mesmas espécies bacterianas que causaram a primeira infecção, geralmente são responsáveis por recidivas. No entanto, as fontes bacterianas podem ser distintas, como cepas que colonizam o intestino, as quais são capazes de aderir a bexiga e causar infecção ou as bactérias que colonizam o epitélio da bexiga, as quais são capazes de periodicamente causar recorrência de ITU (FIORE; FOX, 2014; TERLIZZI et al., 2017). Aproximadamente de 20 a 30% das mulheres adultas que apresentarem um episódio de ITU, experimentarão uma recorrência dentro de 3 a 4 meses. Em crianças, tendem a apresentar ITU antes dos primeiros anos de idade e apresentarão uma recorrência até os 3 anos de idade, sendo que 18% deles terão uma recorrência após alguns meses da primeira ITU (NUUTIEN; UHARI,

2001; SILVERMAN et al., 2013; FIORE; FOX, 2014). No entanto, esses números são subestimados, pois aproximadamente 50% dos pacientes com ITU não procuram atendimento médico (SILVERMAN et al., 2013).

A prevenção de ITU recorrente pode ser farmacológica (antimicrobianos) ou não-farmacológica (terapias alternativas). Durante a gravidez, as ITU recorrentes podem ser frequentes e causar danos graves para a mãe e para o bebê, incluindo o parto prematuro (SCHNEEBERGER et al., 2012). Na menopausa, a terapia hormonal sistêmica não é uma prevenção eficaz e geralmente a bacteriúria assintomática durante esse período não requer tratamento. Após a menopausa, o risco aumenta principalmente por baixos níveis de estrogênio, que muitas vezes são associados à atrofia vaginal. Em mulheres com idade superior a 61 anos, metade sofre de sintomas geniturinários, enquanto 29% apresentam episódios de ITU (MILART et al., 2013; ARNOLD, HEHN; KLEIN, 2016).

Nos estudos de Calbo et al. (2006) e Colodner et al. (2004), foram avaliados pacientes da comunidade, no qual demonstraram que a exposição às cefalosporinas de segunda geração foi um fator de risco independente para a ocorrência ITU de origem comunitária por microrganismos produtores de ESBL.

Em estudo realizado com amostras de urina de pacientes na comunidade em Juiz de Fora, Brasil, entre 2000 e 2002, foram analisados 1.481 isolados, em que 22 (1,48%) foram identificados como produtores de ESBL, dos quais foram 12 *K. pneumoniae*, 7 *E. coli*, 1 *P. stuartii*, 1 *P. freundii* e 1 *S. marcescens*. Dentre as amostras produtoras de ESBL, 95,4% dos isolados foram identificadas como enzimas do tipo TEM, seguidos do tipo SHV. Sete cepas produziram enzimas do tipo CTX-M. O estudo mostrou que cepas produzindo múltiplas b-lactamases também estão presentes em isolados bacterianos adquiridos na comunidade (MINARINI et al., 2006).

HERAS et al. (2017), realizou estudo observacional retrospectivo em hospital terciário em Toledo, na Espanha, com crianças de até 14 anos de idade com infecção no trato urinário por *E. coli* com início na comunidade. No período de 1º de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2016, foram obtidos 229 isolados de *E. coli*, dos quais 21 (9,2%) foram produtores de ESBL. Entre o grupo produtor de ESBL, 14 (66%) eram homens, 5 (23,8%) foram

hospitalizados 30 dias antes da infecção, 12 (57,1%) tinham patologia nefrológica, 6 (28,5%) tiveram refluxo vesicoureteral.

Foram estudados 399 isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBL, provenientes de infecções do trato urinário (ITU) ocorridos entre 2014 e 2016 no Hospital Universitário de Sharjah, Arábia Saudita. Aproximadamente 75% dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* causadores de ITU foram adquiridos na comunidade. ITU com ESBL positivas adquiridas na comunidade apresentaram dentre outros fatores de risco a ITU recorrentes, velhice e presença de cateter vesical. A maioria desses isolados positivos para ESBL eram resistentes a antibióticos como ciprofloxacina (74%) e sulfametoxazol-trimetoprim (73%) que são comumente usados para o tratamento de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade (DASH et al., 2018)

#### 1.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A eficácia do tratamento antimicrobiano depende da identificação e do padrão de resistência antimicrobiana dos uropatógenos responsáveis pela ITU (BARTOLETTI et al, 2016). A prática de prescrever para tratar ITU sem caracterização bacteriana provocou seleção dos uropatógenos resistentes e diminuiu a eficácia das terapias orais. O aumento da resistência aos antimicrobianos representa um problema grave de saúde pública (BLANGO; MULVEY, 2010).

A resistência aos antimicrobianos é o melhor exemplo da rápida adaptação da bactéria a um novo ecossistema. A habilidade da bactéria em ampliar seu nicho ecológico, também na presença de determinados antimicrobianos, pode explicar a aquisição de genes por transferência de material genético através de conjugação, transformação e transdução e/ou pelo acúmulo de mutações pontuais, levando a modificações de genes existentes (SUNDSTROM, 1998; CARATOLLI, 2001). O aumento da resistência antimicrobiana reflete a pressão de seleção devido o uso indiscriminado de antimicrobianos (ZOWAWI et al., 2015).

Por muitos anos, os perfis de resistência para uropatógenos gram negativos comuns, tais como *E. coli* ou *K. pneumoniae* foram relativamente estáveis e previsíveis. Nas últimas décadas, no entanto, esse quadro mudou

drasticamente. Na década de 1980, surgiram as enterobactérias produtoras de ESBL, com a capacidade de inativar os antibióticos comumente utilizados, tais como ceftriaxona ou ceftazidime (DOI et al., 2013). Assim, ESBL em *E. coli* e *K. pneumoniae* tornaram-se comuns, não apenas nas unidades de cuidados de saúde, mas também na comunidade (PATERSON; BONOMO, 2005). A prevalência de resistência bacteriana aos antimicrobianos nas infecções comunitárias vem crescendo nos últimos anos, mas são necessários novos estudos para avaliar dimensão da disseminação (SANTANA, 2012; ZOWAWI et al., 2015).

Devido à resistência a hidrólise por ESBL, os carbapenêmicos têm sido os antibióticos mais frequentemente recomendados para o tratamento de infecções causadas por estas cepas (DOI et al., 2013). No entanto, o consumo mundial de carbapenêmicos aumentou significativamente ao longo das últimas duas décadas, particularmente nos países em desenvolvimento, selecionando as cepas intrinsecamente resistentes e levando ao aumento de resistências a essa classe de antibióticos (AN BOECKEL et al., 2014).

As quinolonas são antimicrobianos utilizados com certa frequência na prática clínica no tratamento empírico de ITU, devido ao largo espectro de atividade, alto potencial bactericida, excelente biodisponibilidade e tolerância. Porém, em estudo de Sorlozano et al. (2014), foi visto que desde 1998 havia relatos do aumento da resistência as fluoroquinolonas. Em 2016, Walker et al. relata que em diversos estudos há o aumento da resistência às fluorquinolonas.

Na Europa, em isolados de UPEC a resistência mostra valores médios de 11,8% para cefalosporinas de terceira geração e 22,3% para fluoroquinolonas. Nos EUA, a UPEC resistente a fluoroquinolonas representou 31,3% de isolados entre pacientes hospitalizados entre 2007 e 2010 (EDELSBERG et al., 2014).

Calbo et al. (2006) observou em estudo caso-controle, entre isolados produtores e não produtores de ESBL, em pacientes da comunidade que o uso prévio de cefuroxima oral foi fortemente associado às ITU de origem comunitária por *E. coli* produtoras de ESBL ( $p < 0,05$ ; OR, 21,42; IC 95%, 5,38-85,22). No entanto, não encontraram nenhuma relação entre o uso de cefalosporinas de terceira geração, ciprofloxacina ou trimetoprim/

sulfametoxazol e ITU por *E. coli* que produtoras de ESBL, o qual explica pela baixa exposição a esses agentes na população estudada.

Achados semelhantes foram relatados por Colodner et al. (2004), em ITU por bactérias produtoras de ESBL em pacientes não hospitalizados, onde a exposição a cefalosporinas de segunda geração foi um fator de risco independente para a ocorrência ITU ( $p < 0,0001$ , OR = 10,1, IC 95%, 4,2-24). Entretanto, no estudo citado o uso prévio de outros antimicrobianos como cefalosporinas de terceira geração ( $p = 0,014$ , OR = 15,8, IC 95%, 1,7-143), quinolonas ( $p = 0,001$ , OR = 4,1, IC 95%, 1,8-9,0) e penicilina ( $p = 0,003$ , OR = 4,0, IC 95%, 1,6-9,0) foram fatores de risco para ocorrência de ITU (Colodner et al., 2004).

Diferentes mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos são descritos em enterobactérias, como: perda ou expressão reduzida de proteínas externas, conhecidas como porinas, hiperexpressão de bomba de efluxo, alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBP) e produção de  $\beta$ -lactamases. O aumento da resistência aos antimicrobianos entre as bactérias gram negativas é um exemplo notável de como estes microrganismos procuram manter e expressar novas informações genéticas que conferem resistência a uma ou a várias drogas (WALSH et al., 2005).

O principal mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias gram negativas é a síntese de  $\beta$ -lactamases, enzimas que as protegem contra a ação letal de antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Os anéis  $\beta$ -lactâmicos são hidrolisados, tornando essas drogas inertes (SANDERS; SANDERS, 1992, RASMUSSEN; HOIBY, 2006).

De acordo com a classificação de Ambler, baseado na identificação da sequência de aminoácidos, as  $\beta$ -lactamases podem ser divididas em quatro diferentes classes moleculares: A, B, C e D. As classes A, C e D usam resíduos de serina na atividade catalítica para a inativação das drogas. Já a classe molecular B são metalo-enzimas, que requerem zinco como cofator para sua ação catalítica. As ESBL pertencem à classe molecular A1 de Ambler e ao subgrupo 2be, de acordo com a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros que são caracterizados por um aumento na hidrólise de oximino- $\beta$ -lactamas e inibição por ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010).

### 1.5 $\beta$ -LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)

ESBL são enzimas capazes de hidrolisar todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos com exceção das cefamicinas (cefotaxima e cefotetan) e de carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem). Sua característica fenotípica importante é que, geralmente, permanecem sensíveis à ação de inibidores de  $\beta$ -lactamases como sulbactam e ácido clavulânico, descritos na década de 70, e tazobactam, descrito na década de 80. Esses inibidores formam um complexo proteico com a  $\beta$ -lactamase, bloqueando, desta maneira, a atividade hidrolítica dessas enzimas (WILLIAMS, 1997).

Considera-se que as  $\beta$ -lactamases evoluíram a partir de proteínas de ligação à penicilina, presentes no cromossomo de alguns gêneros de bactérias gram negativas, com as quais apresentam algumas sequências homólogas. Este desenvolvimento ocorreu, provavelmente, devido à pressão seletiva exercida pelos organismos do solo produtores de  $\beta$ -lactamase encontradas no meio ambiente (GHUYSEN, 1991, BRADFORD, 2001). ESBLs mediadas por plasmídeos são facilmente transmitidas entre membros de *Enterobacteriaceae*, facilitando assim a disseminação de resistência a  $\beta$ -lactâmicos. Além disso, os plasmídeos geralmente carregam genes que codificam co-resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, e sulfametoxazol-trimetoprim (MA et al., 2009, PADMINI, 2017).

A primeira  $\beta$ -lactamase mediada pelo plasmídeo em bactérias gram negativas (*E. coli*) foi descoberta na Grécia, em 1963, foi conhecido como TEM-1. O termo TEM deriva de "Temoniera", nome da paciente de quem foi isolada a primeira cepa de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamase. TEM-2, a primeira enzima derivada de TEM-1, apresenta um único aminoácido substituído na molécula da  $\beta$ -lactamase original (HERITAGE et al., 1999, BRADFORD, 2001). TEM-1 e TEM-2 hidrolizam penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito, como cefalotina ou cefazolina (PADMINI, 2017). Outra  $\beta$ -lactamase mediada pelo plasmídeo é a SHV-1 (Sulfidril variável), enzima mais comumente encontrada em *K. pneumoniae*, foi relatada inicialmente em 1972 e

denominada pela característica química de apresentar variações na ligação ao seu grupo sulfidríla (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

O primeiro isolado de ESBL foi identificado em 1983, a partir de três isolados de *K. pneumoniae* e um de *Serratia marcescens*, no oeste da Alemanha, que demonstraram resistência à cefotaxima e às demais novas cefalosporinas de terceira geração. Esta nova  $\beta$ -lactamase plasmidial chamada SHV-2, derivou de uma mutação de SHV-1 (KNOTHE, 1983). Após 15 anos da descoberta de SHV-2, esta enzima foi detectada em todos os continentes (PATERSON et al., 2003). ESBL do tipo SHV tem sido a causa de surtos não só por *Enterobacteriaceae*, mas também por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (POIREL et al., 2004; HUANG et al., 2004).

A primeira a revelar o fenótipo ESBL na família TEM, foi a TEM-3, em 1987. Desde então, foi observado o aumento rápido no número e nas variantes de espectro ampliado do tipo TEM em todos os países. A combinação na mudança destes aminoácidos resulta em várias alterações sutis no fenótipo ESBL, como a capacidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas, tais como ceftazidima e cefotaxima (HERITAGE et al., 1999; BRADFORD, 2001; STÜRENBURG; MACK, 2003; PATERSON; BONOMO, 2005).

A primeira enzima CTX-M foi descrita na Alemanha em 1989, por Bauernfeind et al. (1992), que relataram o isolamento de uma cepa de *E. coli* resistente a cefotaxima, cuja ESBL não era TEM nem SHV, sendo então designada CTX-M-1, devido à capacidade de hidrolisar cefotaxima. Concomitantemente, grande disseminação de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a cefotaxima foi relatada na América do Sul (BAUERNFEIND et al., 1992; POWER et al., 1999).

As enzimas CTX-M são subclassificadas, em 5 grupos, de acordo com a similaridade nas sequências de aminoácidos: CTX-M-1-, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (JACOBY; BUSH, 2009). As enzimas CTX-M estão fortemente relacionadas com as  $\beta$ -lactamases de *Kluyvera* spp. e se originaram, provavelmente, da transferência horizontal de genes e subsequente mutação dessa enzima em diferentes espécies (BRADFORD et al., 1998; HUMENIUK et al., 2002). Estas enzimas estão envolvidas em surtos de ESBL em hospitais, disseminadas entre estados, países e até mesmo entre os

continentes. O aparecimento e a disseminação destas enzimas são decorrentes da transmissão de plasmídeos ou de amostras epidêmicas, ou ainda por meio de elementos móveis como sequências de inserção, transposons e integrons (COQUE et al., 2002; BONNET, 2004).

Enterobactérias produtoras de ESBL são prevalentes em infecções hospitalares. No entanto, existem evidências de seu aparecimento e disseminação também na comunidade, sendo o trato urinário o sítio clínico mais comumente acometido por bactérias produtoras destes mecanismos de resistência (PATERSON, 2006). Atualmente, ESBL estão disseminadas praticamente entre a maioria das enterobactérias de importância clínica, sendo que há relatos da identificação de mais de 223 diferentes ESBL do tipo TEM, 193 SHV e 172 CTX-M (<http://www.lahey.org/studies>).

A prevalência de isolados com ESBL positivos depende de uma variedade de fatores, incluindo espécies, área geográfica, hospitais, grupos de pacientes e tipos de infecção, tornando sua epidemiologia bastante variada ao redor do mundo (RODRIGUEZ-VILLALOBOS; GLUPCZYNSKI, 2015).

A prevalência de *E. coli* e *Klebsiella* spp. produtores de ESBL na América Latina mostrou um aumento em 2008 em relação aos anos anteriores. Estudos analisados por Ghafourian et al. (2015) revelam que de 30 a 60% de *Klebsiella* spp. são produtoras de ESBL no Brasil, Colômbia e Venezuela. Em 2004, 10% de *E. coli* e 18% de *K. pneumoniae* foram positivos para a produção de ESBL, enquanto que em 2003, esse número era de 10% em *E. coli* e 14% em *K. pneumoniae* (GHAFOURIAN et al., 2015).

Na análise de genótipos de ESBL, os tipos TEM e SHV foram predominantes até a década de 1990. Após a primeira metade dos anos 2000, foi relatado aumento no número de isolados de ESBL do tipo CTX-M, mas as TEM e SHV continuam sendo frequentemente detectados. Os principais microrganismos isolados foram cepas de *E. coli* produtoras de CTX adquiridas na comunidade e cepas de *K. pneumoniae* produtoras de SHV com disseminação em hospitais. (CHONG; ITO; KAMIMURA, 2011).

A disseminação mundial de infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M estão associadas ao aumento da mortalidade, da morbidade, dos custos dos cuidados de saúde e do uso de antimicrobianos de amplo espectro. (PITOUT; LAUPLAND, 2008).

No Brasil, as variantes CTX-M que foram descritas incluem principalmente CTX-M-2 e CTX-M-15 (variantes de CTX-M-1). No entanto, outras variantes, como CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-59 (variantes de CTX-M-2), também foram identificadas. Uma elevada frequência de variantes CTX-M foi descritas na região sudeste do Brasil, especialmente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, onde os grupos CTX-M-2 e CTX-M-1 são predominantes (ROCHA et al, 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de enterobactérias produtoras de  $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido, isoladas de urina, de pacientes da comunidade de Londrina, no período de junho 2016 a maio 2017.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência de uropatógenos em amostras de urina obtidas de pacientes da comunidade, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde e Unidades de Prontos Atendimentos de Londrina, no período de junho 2016 a maio 2017;
- Avaliar os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E.coli* e *K. pneumoniae*;
- Identificar a frequência de isolados de *E.coli*, *K. pneumoniae* e *P.mirabilis* produtores de ESBL;
- Caracterizar por testes fenotípicos as  $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido nos isolados de *E.coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBL;
- Caracterizar por testes genotípicos as  $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido nos isolados de *E.coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBL.
- Identificar os fatores de risco para aquisição de ITU por microrganismos produtores de ESBL, em isolados da comunidade.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de urina foram coletadas pelo Laboratório Central (CentroLab) da Prefeitura de Londrina. As culturas foram selecionadas e analisadas por testes fenotípicos e genotípicos, realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica e no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário de Londrina.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231 e autorizado pela Secretaria de Saúde do Município de Londrina, Paraná.

#### 3.1 AMOSTRAS E TESTE DE SENSIBILIDADE

Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo, descritivo. No período entre junho de 2016 e maio de 2017, foram realizados culturas de urina de pacientes das Unidades Básicas de Saúde e Unidades dos Prontos Atendimentos de Londrina, atendidos pelo Laboratório Central da Prefeitura de Londrina (CentroLab).

Foram incluídas as amostras de urina positivas que apresentaram contagem de colônias  $\geq 10^5$  UFC/mL e até dois microrganismos. Destas, foram selecionadas os isolados de enterobactérias que apresentaram positividade para ESBL pelo sistema automatizado Vitek<sup>®</sup>2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Foram excluídas amostras (1) de um paciente com mesmo microorganismo já isolado, (2) pacientes em internação domiciliar e (3) pacientes residentes em casa de repouso. As amostras foram armazenadas em ágar nutriente (temperatura ambiente) e em TSB (*Tryptic Soy Broth*) com glicerina 15% (-20°C), até a realização dos testes.

Na identificação de microrganismos gram positivos foi utilizado o cartão VITEK<sup>®</sup>2 GP ID. Para a identificação de gram negativos utilizou-se o cartão VITEK<sup>®</sup>2 GN ID e o cartão VITEK<sup>®</sup>2 AST238 para antibiograma dos gram negativos urinários (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Os antimicrobianos avaliados foram: ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, cefepime, meropenem, ertapenem, amoxicilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, norfloxacina, ácido nalidixico, nitrofurantoína e

sulfametoazol/trimetoprim. A interpretação foi realizada de acordo com os critérios do CLSI 2017 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

### 3.2 COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

Foram coletados dados demográficos de todos os pacientes, incluindo idade, gênero, local de atendimento e gestação, através do sistema WebSaúde oferecido pela rede de saúde pública da prefeitura de Londrina.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS $\beta$ -LACTAMASES

#### 3.3.1 Testes Fenotípicos

##### 3.3.1.1 Teste de Duplo Disco Sinergismo (DDS)

A produção de ESBL foi confirmada pelo teste de duplo disco aproximação com sinergismo entre os discos de amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonam, cefepime, cefotaxima e ceftazidima (Oxoid<sup>®</sup>; Basingstoke, England), como previamente descrito (JARLIER et al., 1988; JACOBY; HAN, 1996). A produção da distorção dos halos é considerada teste positivo. *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

##### 3.3.1.2 Teste em ágar ChromID<sup>®</sup> ESBL

As amostras negativas no teste de DDS foram submetidas a novo teste fenotípico. O ChromID<sup>®</sup> ESBL (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) está baseado em um ágar com substratos cromogênicos e uma mistura patenteada de antimicrobianos, projetada especialmente para permitir a identificação direta e o crescimento seletivo da enterobactéria produtora de ESBL. Este meio proporciona resultados em 18-24 horas, incubado à 35°C  $\pm$  1°C.

#### 3.3.2 Testes Genotípicos

O DNA foi preparado para PCR simples e multiplex usando o método de fervura. De três a 5 colônias foram suspensas em 0,5 ml de água ultra pura e fervido durante 10 minutos (min), seguido de choque térmico por 5 min. A

suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10min e o sobrenadante foi utilizado. As amostras que apresentaram o teste fenotípico positivo foram caracterizadas genotipicamente por PCR, utilizando *primers* específicos para *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M1</sub>, *bla*<sub>CTX-M2</sub>, *bla*<sub>CTX-M8</sub>, *bla*<sub>CTX-M9</sub> e *bla*<sub>CTX-M25</sub>.

Para os genes de *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>, a técnica foi realizada conforme descrito por Bedenic et al. (2001) e Arlet e Philippon (1991), respectivamente, através de PCR *single*, utilizando os *primers* TEM F (*forward*)/ TEM R (*reverse*) e SHVF/ SHVR, respectivamente. As amplificações de TEM e SHV foram constituídas de uma etapa de desnaturação inicial de 5min a 95°C e 30 ciclos de amplificação, sendo cada um desses com 1min a 95°C para desnaturação, 7min a 58°C e 55°C, respectivamente, para hibridização, 2min a 72°C para extensão, seguidos por etapa de extensão adicional de 7min a 72°C.

As sequências de alelos de referência de *bla*<sub>CTX-M</sub> foram comparadas e as regiões características do grupo identificadas de acordo com Woodford et al. (2005). Os *primers* específicos para alelos que codificam enzimas pertencentes aos grupos 1, 2 e 9 são respectivamente CTX-M1F e CTX-M1R, CTX-M2F e CTX-M2R e CTX-M9F e CTX-M9R. Fragmentos de alelos que codificam enzimas dos grupos 8 e 25 foram amplificados com dois *primers* diretos específicos e um primário reverso compartilhado, CTX-M8F, CTX-M25F e CTX-M8/ 25R, respectivamente. De acordo com Woodfort et al., 2005, foi realizada a técnica de PCR multiplex, através do TopTaq<sup>®</sup> Master Mix Kit (QIAGEN<sup>®</sup>), com condições de amplificação, como: desnaturação inicial de 5min a 94°C; 30 ciclos de 25 segundos (s) a 94°C de desnaturação, 40s a 52°C para hidridização e 50s a 72°C de extensão e um alongamento final de 6min a 72°C.

Os produtos da reação de PCR *single* foram analisados em gel de agarose a 1,0% em solução de Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x. Na aplicação no gel de agarose foram adicionados 4 µL de tampão de amostra. A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 40 minutos. O marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen<sup>®</sup>) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Após a corrida o gel foi adicionado à solução de brometo de etídio (0,08 µL/100 mL) por 15min e visualizado em luz ultravioleta Já os amplicons da reação de PCR multiplex foram analisados em gel de agarose a 2,0% em TBE 1x, ou seja, diluído 1 para 10 partes. A eletroforese foi realizada a 80 volts,

por 120 minutos. O marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®) foi aplicado no gel para diferenciar o tamanho dos fragmentos obtidos.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados categóricos foram demonstrados através de frequência e percentual. A análise foi realizada pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fischer, quando necessário. Para avaliar os potenciais fatores de risco foi realizada regressão logística (OR, IC95%). O nível de significância alfa estipulado foi igual a 0,05. As análises dos dados foram realizadas com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20 para Windows.

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

A partir da análise dos resultados foi redigido o Artigo I, o qual foi submetido a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Fator de Impacto de 2,605). As instruções para o autor estão em ANEXO I.

### ARTIGO I

## **Prevalence of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteria in Community-Acquired Urinary Tract Infections, in Brazil**

Juliana Buck Dias<sup>1</sup>, Eliana Carolina Vespero<sup>2</sup>

[1] Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

[2] Docente do Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

## Abstract

There has been a sustained and dramatic increase in community acquired urinary tract infections (CA-UTI) caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria in the last years. Despite this, few studies have been performed in low- or middle-income countries. The main objective of this manuscript was to characterize ESBL CA-UTI in a study carried out in the city of Londrina, from June 2016 to May 2017. The identification of uropathogens and ESBL detection was performed according to the Vitek<sup>®</sup> 2 automation system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). In this period, 8,275 uropathogens were isolated, of which 488 (6.7%) were ESBL producers, according to the Vitek<sup>®</sup> 2 automation system. The results were confirmed by ChromID<sup>®</sup> ESBL (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and DDS methods. In the period of study, 5,761 (69.8%) *E. coli* isolates were identified, of which 329 (5.7%) were ESBL producers and 688 *K. pneumoniae* isolates, of which 159 (24.2%) were ESBL producers. Between ESBL isolates, 368 (75.3%) were female patients and older than 65 years. Pregnancy was not a risk factor for CA-UTI for ESBL-producing enterobacteria. The frequency of *bla* genotypes ESBL showed that *bla*<sub>TEM</sub>, alone and/or double groups, were detected to harbor in 24.6% (81/329) ESBL-producing *E. coli* and 36.4% (58/159) ESBL-producing *K. pneumoniae*, *bla*<sub>SHV</sub> in 28.5% (94/329) and 23.2% (37/159) isolates, respectively and *bla*<sub>CTX-M</sub> in 83.5% (275/329) and 83.0% (132/159) ESBL-producing isolates. *bla*<sub>CTX-M-1</sub> positive groups were detected at 54.4% (179/329) ESBL-producing *E. coli* and 56.6% (90/159) ESBL-producing *K. pneumoniae*, alone and/or double *bla* groups. This study has described the emergence of ESBLs among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates obtained from CA-UTI.

**Key-words:** Urinary Tract Infections; Community-Acquired Infections; *Enterobacteriaceae*;  $\beta$ -lactamases.

## Introduction

Urinary tract infections (UTI) are a very common healthcare issue and represent the second most common type of infection in humans. In the USA and Latin America, the incidence of UTIs is 0.5–0.7 episodes per year among young women [1,2]. The main bacterial pathogens isolated from UTI patients include gram-negative *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella*

*pneumoniae* and *Proteus mirabilis*, and gram-positive species, such as *Staphylococcus saprophyticus* [3,4].

The treatment and control of UTIs are accomplished through drug therapy with antibiotics of different classes. As much as 90% of UTIs are caused by *E. coli*, the empiric antimicrobial treatment is directed mostly towards this pathogen [2]. However antibiotic resistance has become a concern in the community. Due to resistance, it is difficult to choose early empiric antibiotics for urinary tract infections (UTI), which are a common infection in the community. Many countries implemented national plans to control this public health threat [5]. In particular, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-PE) are co-resistant to other non- $\beta$ -lactam antimicrobials [6,7].

ESBLs are enzymes commonly associated with TEM and SHV. However, some *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates possess the gene encoding *ampC* cephalosporinase [8,9]. Moreover, CTX-M-type ESBL have emerged within the community, particularly among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from UTIs, with a widespread prevalence and multidrug resistance in many countries worldwide, since the 1980s [10].

CTX-M ESBL in uropathogens isolated from the community is cause for concern due to the enormous potential for multidrug resistance from strains that produce these enzymes, which could lead to failure of empirically-administered therapies and development of complicated UTIs [11]. The numerous CTX-M variants that have been reported to date can be divided into five groups according to similarities in their amino acid sequences: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, and CTX-M-25 [12].

Many study [5,13] have demonstrated that the most relevant finding is the identification of a very high frequency of community-acquired urinary tract infections (CA-UTI), principally in *E.coli*. This should alert clinicians that the treatment of community-acquired infections is gradually becoming a more hostile environment. Also the importance of considering the risk factors, as previous hospitalization, previous surgery, and antibiotic use, as well as chronic corticosteroid use and diabetes mellitus, in empirical antibioticotherapy [14].

Although in Brazil, nationwide surveillance programs describe the epidemiology of these infections in hospitalized patients, relatively little is known about the spread of ESBL in patients with UTI in the community. The present

study evaluated the frequency and type of ESBL, in *E.coli* and *K. pneumoniae*, in community UTI, isolated from a municipality in southern Brazil.

## **Material and Methods**

### **Samples**

In the period from June 2016 to May 2017, the urine cultures of patients from the Basic Health Units (BHU) and Units of the Prepared Attendances (UPA) of Londrina were analyzed, performed by the Central Laboratory of the City of Londrina (CentroLab). Samples were plated with 1µl calibrated loops to split onto ChromID<sup>®</sup> CPS<sup>®</sup> agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Identification, antimicrobial susceptibility testing and ESBL producers were performed using Vitek<sup>®</sup> 2 automated system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). For ESBL analysis, repeated isolates of etiologic agent were excluded, so one isolate per patient was analyzed. These samples were stored in nutrient agar (room temperature) and TSB (Tryptic Soy Broth) with 15% glycerol (-20° C) until the tests were carried out. UTI was defined as a positive urine culture when the colony counts were  $\geq 10^5$ CFU/mL [15].

The study was approved by the Ethics and Research Committee of the State University of Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231 and authorized by the Health Department of the Londrina city, Paraná.

### **Collected Data**

Demographic data including age, sex, pregnancy and place of care were collected for all the patients through the WebSaúde system of the Londrina prefecture.

### **Antimicrobial susceptibility**

Bacterial identification and antibiotic susceptibility testing were performed using the Vitek<sup>®</sup> 2 automated system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Using AST238 panel which contains the following antimicrobials: ertapenem, cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, cefepime, amikacin, gentamicin, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, norfloxacin, nitrofurantoin. The antimicrobial sensitivity profile was realized according to the interpretation criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute [16]. The data

obtained by the automated system were used to select positive samples for ESBL.

## Phenotypic Testes

### *Double Disc Synergism Test (DDS)*

ESBL production was confirmed by the double-disc test with synergism between the amoxicillin/clavulanic acid, aztreonam cefepime, cefotaxime and ceftazidime disks, (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England) as previously described [16]. The production of distortion of the halos is considered positive test. *K. pneumoniae* ATCC 700603 and *E. coli* ATCC 25922 were used as positive and negative controls, respectively.

### *ChromID<sup>®</sup> Agar Test ESBL*

Negatives samples in the DDS test were submitted to a new phenotypic test. ChromID<sup>®</sup> ESBL (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) is based in chromogenic substrates on an agar and a patented blend of antimicrobials, designed specifically to allow the direct identification and selective growth of the ESBL-producing enterobacterial. This agar provides results in 18-24 hours, incubated at 35°C ±1.

## Genotypic Tests

ESBL characterization was performed by the PCR technique using specific primers for genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, as previously described [17,18], respectively. Detection of the *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were performed by multiplex PCR, as described by [19]. The PCR reaction was enhanced using the TopTaq<sup>®</sup> Master Mix Kit (QIAGEN).

## Data Analysis

Categorical variables were reported for frequencies with proportions. Pearson *Chi squares* test or Fisher's *test* were used to compare difference between ESBL-negative pathogens and ESBL-positive pathogens. To evaluate the potential risk factors, logistic regression analysis (OR, IC95%) was performed. Statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ . Analyses were

performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20 (IBM Corp, New York, USA).

## Results

During the study period, 56.555 urocultures were realized in Central Laboratory (CentroLab) of the City of Londrina-Paraná from patients attend in Basic Health Units and Prepared Care Units of Londrina. A total of 8.275 (14,6%) urinary isolates, 7.189 (86.9%) gram negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* family were isolated, 1005 (11.9%) gram-positive cocci and 79 (0.94%) nonfermentative gram negative rods. *E.coli* with 5.761 (69.8%), followed by *K. pneumoniae* 688 (8.3%), *Proteus mirabilis* 334 (4,0%) and others enterobacterias 406 (5.2%) were the most frequent uropathogens.

Table 1. Frequency of uropathogens from patients attended at the Basic Health Units and Units of Ready Care in Londrina, from June 2016 to May 2017.

<b>Uropathogens</b>	<b>Frequency (n)</b>	<b>Percentage (%)</b>
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>		
<i>Escherichia coli</i>	5761	69.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	688	8.3
<i>Proteus mirabilis</i>	334	4.0
<i>Citrobacter koseri</i>	106	1.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	83	1.0
<i>Morganella morganii</i>	49	0.6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	65	0.8
<i>Citrobacter freundii</i>	23	0.3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	33	0.4
outras enterobactérias	47	0.6
<b>Gram-positive cocci</b>		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	375	4.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	82	1.0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	203	2.4
<i>Enterococcus faecalis</i>	178	2.1
Others	168	2.0
<b>Nonfermentative gram negative rods</b>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75	0.8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	0.0
<b>Total</b>	<b>8275</b>	<b>100.0</b>

The ESBL production was found in 488/8275 (5.8%) according to the Vitek<sup>®</sup> 2 automation system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), *E. coli* 329/5761 (5.7%) and *K. pneumoniae* 159/688 (23.1%). The table 1, shows the frequency of uropathogens in the studied period.

Table 2. Univariate and multivariate analysis of risk factors for ESBL-producing microorganisms, from patients attended at the Basic Health Units and Units of Prepared Attendances of Londrina, from June 2016 to May 2017.

CHARACTERISTICS	ESBL NEGATIVE	ESBL POSITIVE	p value ( $\alpha=0,05$ )	OR (IC 95%)
	n=6701 (%)	n=488 (%)		
<b>Gender</b>				
Female	6063 (94.3)	368 (5.7)	< 0,001	3.08 (2.46-3.84)
Male	638 (84.2)	120 (15.8)		
<b>Age group (years)</b>				
0-14	551 (97.2)	16 (2.8)	< 0,001	3.39 (2.82-4.09) <sup>(b)</sup>
15-45	2534 (97.8)	84 (3.2)		
46-65	1850 (94.0)	118 (6.0)		
≥66	1766 (86.7)	270 (13.2)		
<b>Pregnant<sup>(a)</sup></b>				
No	5475 (93.9)	351 (6.1)	< 0,001	2.19 (1.34-3.60)
Yes	588 (97.2)	17(2.1)		
<b>Attendance</b>				
Ambulatory	6576 (93.2)	477 (6.8)	0,538	
Ready Care	125 (91.9)	11 (8.1)		
<b>Organism</b>				
<i>E. coli</i>	5434 (94.3)	329 (5.7)	<0.001	
<i>K. pneumoniae</i>	529 (76.9)	159 (23.1)		

Chi-square test. <sup>(a)</sup> n for pregnant is 6431. <sup>(b)</sup> Age group divided into ≤65 years and >65 years.

Univariate analysis indicated that ESBL-positive was more likely to be associated with females and old age (≥66 years old). It also showed that there wasn't association between pregnant and ESBL producers. *E.coli* was microorganism the most frequent, p-value ≤ 0.001 (Table 2).

Logistic regression model revealed that gender (odds ratio 3.08, 95% confidence interval 2.46-3.84) and age (odds ratio 3.39, 95% confidence interval 2.82–4.09) UTI were significant factors in predicting urinary tract infections due to ESBL producing pathogens such as *E.coli* and *K. pneumoniae* (Table 2).

When It was enhanced to distribution of ESBL-producing uropathogens in the Londrina city, was observed that it was higher in the northern region, with 141 (28.8%) of the isolates. The relationship between the isolated microorganism and the regions, *E. coli* was more frequent in all region (Table 3). Proportionally, UBS with the highest frequency of ESBL-producing *E. coli* isolates was UBS Armindo Guazzi, located in the eastern region of Londrina, with 19 (38.0%) samples. Nevertheless, the marjority isolates of *K. pneumoniae* were from UBS Marabá, with 8 (31.0%) isolates.

Table 3. Frequency of microorganisms producing ESBL in relation to the Londrina regions and districts, from June 2016 to May 2017

Microorganism	Region						Total (%)
	Center (%)	North (%)	East (%)	West (%)	South (%)	Rural (%)	
<i>E.coli</i>	45 (13,6)	99 (30,0)	58 (17,5)	65 (19,6)	51 (15,4)	13 (3,9)	330 (100)
<i>K. pneumoniae</i>	25 (15,7)	42 (26,4)	26 (16,4)	31 (19,5)	28 (17,6)	7 (4,4)	159 (100)

Table 4. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of all isolates, the general sensitivity profiles of the non-ESBL isolates and the ESBL-producing isolates by Vitek<sup>®</sup> 2 for the clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* urocultures in the June 2016 to May 2017.

<i>E. coli</i> (n= 5761)	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range	%S	%S	%S	p value	
	ALL	ALL		ALL	ESBLN	ESBLP		
<b>Betalactam</b>								
Ampicillin (*)	8	32	< 2-> 32	55	56	0	<0.001	
Cephalothin (*)	8	32	< 2-> 64	50	53	0		
Ceftriaxone	1	1	< 1-> 64	95	99	2		
Cefepime	1	1	< 1-> 64	99	99	4		
Meropenem	0,25	0,25	< 0,25-> 16	99	99	99		
Ertapenem	0,5	0,5	< 0,5-> 8	99	99	99		
Amoxicillin/clavulanate	4	16	< 2-> 32	87	89	55		
Piperacillin/Tazobactam	4	4	< 4-> 128	95	99	85		
<b>Aminoglycosides</b>								
Amikacin	2	4	< 2-> 64	99	99	98		
Gentamicin	1	1	< 1-> 16	94	95	73		
<b>Quinolones</b>								
Ciprofloxacin	0,25	4	< 0,25-> 4	80	86	29		
Norfloxacin	0,5	16	< 0,5-> 16	80	86	29		
Nalidixic Acid	4	32	< 2-> 32	71	74	19		
<b>Others</b>								
Nitrofurantoin	16	16	< 16-> 256	96	97	88		
Trimetropim/Sulfametoxazole	1	16	< 1-> 16	69	72	43		

<i>K. pneumoniae</i> (n=688)	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range	%S	%S	%S	p value
	ALL	ALL		ALL	ESBLN	ESBLP	
<b>Betalactam</b>							
Ampicillin (*)	2	32	< 2-> 32	4	0	0	1.000
Cephalothin (*)	2	64	< 2-> 64	70	86	0	
Ceftriaxone (*)	1	64	< 1-> 64	75	95	0	
Cefepime (*)	1	64	< 1-> 64	81	95	0	
Meropenem	0,25	0,25	< 0,25-> 16	90	95	75	
Ertapenem	0,5	0,5	< 0,5-> 8	90	95	75	
Amoxicillin/clavulanate	2	32	< 2-> 32	74	89	16	
Piperacillin/Tazobactam	4	128	< 4-> 128	79	94	30	
<b>Aminoglycosides</b>							
Amikacin	2	8	< 2-> 64	95	97	88	<0.001
Gentamicin	1	16	< 1-> 16	86	94	53	
<b>Quinolones</b>							
Ciprofloxacin	0,25	4	< 0,25-> 4	66	85	6	
Norfloxacin	0,5	16	< 0,5-> 16	66	84	7	
Nalidixic Acid	4	32	< 2-> 32	64	81	3	
<b>Others</b>							
Nitrofurantoin	64	>256	< 16-> 256	35	42	13	
Trimetropim/Sulfametoxazole	1	16	< 1-> 16	79	90	40	

<sup>(a)</sup> Fisher's Exact Test. MIC: Minimum Inhibitory Concentration (µg/L). ESBLN: Extended-spectrum beta-lactamase negative. ESBLP: Extended-spectrum beta-lactamase positive.

Table 4 shows the sensitivity profile of *E.coli* and *K.pneumoniae* ESBL-producing and not producing. For ESBL-producing *E. coli*, the antimicrobials meropenem and ertapenem (96.0%), and amikacin (98.0%) showed high sensibility, as well nitrofurantoin (88.0%) and gentamycin (73.0%). However, quinolones as nalidixic acid (19.0%), norfloxacin and ciprofloxacin (29.0%) presented low sensibility. For ESBL producing *K. pneumoniae* amikacin showed 88.0% sensibility, followed by meropenem and ertapenem (75.0%) and gentamicin (53.0%).

Table 5. Phenotypic detection of *E. coli* and *K. pneumoniae* producing ESBL in clinical isolates of urocultures of patients from the community, from June 2016 to May 2017.

Characteristics	<i>E. coli</i> (n= 329)		<i>K. pneumoniae</i> (n=159)	
	Frequency	(%)	Frequency	(%)
Ceftriaxone	321	97.2	159	100.0
Cefepime	314	95.1	159	100.0
gene <i>bla</i> PCR	302	92.5	142	89.3
DDS phenotypic test	244	73.9	127	79.9
ChromID <sup>®</sup> ESBL	322	97.5	157	98.7

DDS: Double Disc Synergy. PCR: Polymerase Chain Reaction.

Of the 488 ESBL-producing isolates identified by the Vitek<sup>®</sup> 2 automation system, 371 (74.3%) were confirmed by the DDS phenotypic test, with a frequency of 244 (73.9%) to ESBL-producing *E. coli* and 157 (79.9%) to ESBL-producing *K. pneumoniae*. Already in the phenotypic test by the Chrom<sup>®</sup> ID ESBL agar, 322 (97.5%) and 157 (98.7%) samples were positive to ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*, respectively (Table 5).

Table 6. Distribution of the *bla* genotypes of 488 isolates, between ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae* positive urocultures, of patients from the community, from June 2016 to May 2017.

Genes	<i>E. coli</i> (n=329)		<i>K. pneumoniae</i> (n=159)	
	Frequency	%	Frequency	%
TEM	5	1.2	7	4.5
SHV	9	2.4	1	0.6
CTX-M-1	95	28.8	44	27.7
CTX-M-2	15	4.5	3	1.9
CTX-M-8	1	0.4	1	0.6
CTX-M-9	45	13.7	18	11.4
CTX-M-25	1	0.4	3	1.9
TEM + SHV	12	3.6	1	0.6
TEM + SHV + CTX-M	36	11.2	27	16.9
TEM + CTX-M	28	8.6	23	14.5
SHV + CTX-M	37	11.3	8	5.0
CTX-M-1 + CTX-M-2	4	1.2	1	0.6
CTX-M-1 + CTX-M-2 + CTX-M-9	1	0.4	0	0.0
CTX-M-1 + CTX-M-25	1	0.4	0	0.0
CTX-M-1 + CTX-M-9	7	2.2	1	0.6
CTX-M-2 + CTX-M-8 + CTX-M-9 + CTX-M-25	0	0.0	1	0.6
CTX-M-2 + CTX-M-9	4	1.2	1	0.6
CTX-M-8 + CTX-M-9	0	0.0	1	0.6
Others	28	8.5	18	11.4

p-value (Chi-square test) for TEM=0.026; SHV=0.415; CTX-M-1=0.774, CTX-M-2=0.090, CTX-M-8=0.183, CTX-M-9=0.901, CTX-M-25= 0.135.

In Table 6 showed the frequency of *bla* genotypes ESBL. *bla*<sub>TEM</sub>, alone and/or double groups, were detect to harbor in 24.6% (81/329) ESBL producing *E. coli* and 36.4% (58/159) ESBL producing *K. pneumoniae*. *bla*<sub>SHV</sub> alone and/or double groups, were detect to harbor in 28.5% (94/329) ESBL producing *E. coli* and 23.2% (37/159) ESBL producing *K. pneumoniae*. *bla*<sub>CTX-M</sub> alone and/or

double groups, were detected to harbor in 83.5% (275/329) ESBL producing *E. coli* and 83.0% (132/159) ESBL producing *K. pneumoniae*.

Beyond that, it is observed that 83.4% (407/489) of the isolates were detected to harbor *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, and *bla*<sub>CTX-M-1</sub> positive groups were detected at 54.4% (179/329) ESBL producing *E. coli* and 56.6% (90/159) ESBL producing *K. pneumoniae*, alone and/or double groups. *bla*<sub>CTX-M-9</sub> positive were a second group accounted for ESBL producing *E. coli* 24.5% (81/329) and ESBL producing *K. pneumoniae* 24.5% (38/159), alone and/or double groups. *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-25</sub> groups were detected in low taxes the isolates 10.6% (35/329), 0.30% (1/329) and 1.21% (4/329), respectively for ESBL producing *E. coli*, and 5.0% (8/159), 1.3% (2/159) and 3.1% (5/159), respectively for ESBL producing *K. pneumoniae*. According to the statistical test p-value (Chi-square test), no gene had a significant factors in predicting ESBL producing pathogens, however the CTX-M-2 gene showed a tendency to be frequent in *E. coli* isolates ( $p=0.090$ )

## Discussion

Resistance to antibiotic treatment in patients with CA-UTI is a representative example of the increasing problem of antimicrobial resistance. The emergence and rapid worldwide dissemination of ESBL-producing bacteria has clearly shown that *E. coli* antibiotic resistance is currently a real public health concern [20].

We conducted a prospective study on CA-UTI during a one year in Londrina City and we found patients with UTI by ESBL produced *E. coli* and/or *K. pneumoniae*. High rates of ESBL producing enterobacteria was found in Korea, showed an overall increasing pattern in CA-UTIs, in 2016, where the rate was 13.8% [21]. In another study carried out in Paris in 2015, where evaluated antimicrobial resistance in CA-UTI, the authors found Gram-negative bacilli, *Enterobacteriaceae*, isolated in 99% of urophatogens and the prevalence of ESBL producing *Enterobacteriaceae* was 4% [6]. The prevalence seems to be higher than that reported in others published data [6], but is consistent with data of a recent study on fecal carriage in the same area [24] and confirms the continuous increase in ESBL prevalence among UTI patients. High ratio ESBL

producers *E.coli* was obtained in a study with children, realized by Nisha et al. [26], in USA, with a total of 523 children with culture-proven *E. coli* CA-UTI, 319 (60.9%) were boys and 204 (39.1%) girls. ESBL positivity was seen in 196 (37.5%), of which 131 (66.8%) were boys and 65 (33.2%) girls.

High ratio results were obtained in Colombia, ESBL production found among community isolates of *E. coli* was 11.7% and 19.0% for *K. pneumoniae*, rates similar to that found in hospital isolates; *K. pneumoniae* is the main ESBL-producing organism worldwide. In Latin American countries, community-acquired ESBLs are starting to appear with rates up to 28.7% among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates, while in Europe reported rates are of only 1.5% to 5.6%, respectively. The presence of ESBL-producing urinary isolates in the community is a significant public health problem that unavoidably increases health care costs for patients and health care providers due to the use of carbapenems, since the oral agents (nitrofurantoin and fosfomycin) [12].

In agreement with recent data, published by Park and colleagues [21], that observed results similar, in this study, the most common causative pathogen of UTI was *E. coli* (80.3%), followed by *K. pneumoniae*. Also, significant risk factors for UTI by ESBL producing enterobacteria were advanced age and recurrent UTI. However pregnancy status and care in ready care were not associated with ESBL produced enterobacteria.

Different results to the one obtained in this one were demonstrated by Park and colleagues [21] in a study carried out in Korea, with Enterobacteriaceae in CA-UTI, overall, amikacin, ertapenem and imipenem showed the lowest resistance rates at 0.1%, 0.2% and 0.3%, respectively. Cefepime (2.4%), piperacillin-tazobactam (3.5%), ceftazidime (3.9%), and aztreonam (6.0%) had lower than 10% total resistance rates. Similar results to our study was obtained in China (30), all the ESBL-*E. coli* isolates had high susceptibility rates to imipenem (97.5%), meropenem (99.2%), ertapenem (95.1%), tigecycline (99.0%), colistin (95.1%), piperacillin/tazobactam (89.3%) and amikacin (88.4%). A majority of ESBL-*E.coli* isolates were resistant to ceftazidime (58.6%), cefepime (91.7%), aztreonam (84.4%) and ciprofloxacin (81.2%).

ESBLs have emerged gradually during the last decades in species of

*Enterobacteriaceae* and their prevalences reach alarming rates. Infections caused by such pathogens often limit therapeutic options and cause treatment failures [25]. In study realized by Singh and Singh 2014 [26], they compare the capacity of six phenotypic methods to detect ESBLs in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. The Vitek<sup>®</sup> 2 showed a sensitivity and specificity of 91.8% and 97.24%, respectively, with a positive predictive value of 93.33%. The sensitivities of the conventional methods ranged from 83% to 94%. The highest sensitivity and specificity were shown by combined disk (93.44%) and double disk synergy (100%) techniques, respectively. And concluded that Vitek<sup>®</sup> 2 showed an acceptable capacity to detect ESBL isolates as it improved the turnover time (6 to 8 hours) in comparison to conventional phenotypic methods, which took a minimum of 24 hours. However, the combined disk test achieved the highest sensitivity. Also Numanovic et al 2013 [27] did not find any statistically significant difference in the results of detection of ESBL producers using molecular techniques and VITEK<sup>®</sup> 2. Our results demonstrated that ChromID<sup>®</sup> ESBL presented better results when compared to the phenotypic test of DDS. Also the antimicrobials ceftriaxone and cefepime were good predictors for the detection of ESBL.

The main mechanism of bacterial resistance to the  $\beta$ -lactam class of antibiotics consists of the production of  $\beta$ -lactamases. Although the description of the first CTX-M enzymes came from Europe, South America was the first continent where they became prevalent. It now appears that CTX-M enzymes had been widely distributed in South America from 1989 [28]. A 2010–2011 survey in the United States showed that CTX-M type accounted for 85.4% of ESBL-producing *E. coli* strains [29]. In China, CTX-M-type ESBLs accounted for more than 70% ESBL-producing *E. coli* strains over the past 10 years; CTX-M-14 remains the most abundant genotype, although the detection rate of CTX-M-15 has shown a continuously increasing trend in recent years [30]. Similar findings were obtained in the present study, *bla*<sub>CTX-M</sub> alone and/or double groups, were detected to harbor in majority ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. And CTX-M-2 group showed major association with *E. coli* isolates.

This study has described the emergence of ESBLs among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates obtained from CA-UTI. Also this study examined the drug

resistance and genotypic epidemiology of clinical isolates of ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. We found that the CTX-M type is still the primary genotype of ESBL in Brazil and that its proportion has increased. This should alert clinicians that the treatment of community-acquired infections is gradually becoming a more hostile environment. The main risk factors identified in this study (age, gender) should be considered when treating this type of infection. A larger study focused on ESBL CAUTI is required to determine the importance of other risk factors. In summary we have demonstrated that ESBL-producing uropathogens remain susceptible to last resort, broad-spectrum antimicrobials such as carbapenems and that nitrofurantoin remains useful as initial therapy in uncomplicated cases of ESBL-producing *E. coli* UTI. In summary, regional variation in etiology of CA-UTI and antibiotic susceptibility observed in our study emphasizes the need to establish local and national antimicrobial resistance monitoring systems in Brazil to provide information for the development of CAUTI treatment guidelines.

## References

1. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, Moran JG, Nicolle LE, Raz R, Schaeffer A, Soper DE 2011. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 52: e103-e120.
2. Bader MS, Loeb M, Books AA 2017. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgrad Med* 129: 242-258.
3. Akoachere JFTK, Yvonne S, Akum NH, Seraphine EN 2012. Etiologic profile and antimicrobial susceptibility of community-acquired urinary tract infection in two Cameroonian towns. *BMC Res Notes* 5: 219
4. Castillo-Tokumori F, Irey-Salgado C, Málaga G 2017. Worrisome high frequency of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in community-acquired urinary tract infections: a case-control study. *Int J Infect Dis* 55: 16-19.
5. Reis ACC, Santos SRS, Souza SCD, Saldanha MG, Pitanga TN, Oliveira RR 2016. Ciprofloxacin resistance pattern among bacteria isolated from patients with community-acquired urinary tract infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paul* 58:53.
6. Chervet D, Lortholary O, Zahar JR, Dufougeray A, Pilmis B, Partouche H 2017. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections in Paris in 2015. *Med Mal Infect* 17: e29054298.

7. Rodríguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A 2004. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 42:1089-1094.
8. Azap OK, Arslan H, Serefhanoglu K, Colakoğlu S, Erdoğan H, Timurkaynak F, Senger SS 2010. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase positivity in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Clin Microbiol Infect* 16:147-151.
9. Celik AD, Yulugkural Z, Kuloglu F, Eroglu C, Torol S, Vahaboğlu H, Akata F 2010. CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from community acquired upper urinary tract infections at a university in the European part of Turkey. *J Microbiol Immunol Infect* 43:163–167.
10. Ambler RP. The structure of beta-lactamases 1980. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289:321–331
11. Rocha FR, Pinto VPT, Barbosa FCB 2016. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum b-Lactamases in Brazil: A Systematic. Review. *Microbial Drug Resist* 22:301-311.
12. Martinez P, Garzón D, Mattar S 2012. CTX-M-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. *Braz J Infect Dis* 16: 420-425.
13. Naseer U, Sundsfjord A 2011. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug Resist* 17:83–97.
14. Boix-Palop L, Xercavins M, Badía C, Obradors M, Riera M, Freixas N, Pérez J, Rodríguez-Carballeira M, Garau J, Calbo E 2017. Emerging extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* causing community-onset urinary tract infections: a case-control-control study. *Int J Antimicrob Agents* 50:197-202.
15. Agência Nacional De Vigilância Sanitária - Brasil 2017. Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. *Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde* 2017: 67.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute 2017. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9; ISBN 1-56238-784-7. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017
17. Arlet G, Philippon A 1991. Construction of polymerase chain reaction and use of intragenic Dna probes for three main types of transferable Beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett* 66:19-25.
18. Bedenic B, Randegger CC, Stobberingh E, Häckler H 2001. Molecular epidemiology of extended spectrum  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Zagreb, Croatia. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis* 20:505-508.
19. Woodford N; Fagan EJ; Ellington MJ 2005. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 57: 154-155.

20. Mukherjee M, Basu S, Mukherjee S K, Majumder M 2013. Multidrug-resistance and extended spectrum beta-lactamase production in uropathogenic *E. coli* which were isolated from hospitalized patients in Kolkata, India. *J Clin Diagn Res* 7: 449-453.
- 21 Park JJ, Seo YB, Lee J 2017. Antimicrobial susceptibilities in urinary tract infection. *Infect Chemother* 49:184-193.
22. Martin D, Fougnot S, Grobost F, Thibaut-Jovelin S, Ballereau F, Gueudet T, de Mouy D, Robert J 2016. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in community-onset urinary tract infections in France in 2013. *J Infect* 72:201-206.
23. Nicolas-Chanoine M-H, Gruson C, Bialek-Davenet S, Bertrand X, Thomas-Jean F, Bert F, Moyat M, Meiller E, Marcon E, Danchin N, Noussair L, Moreau R, Leflon-Guibout V 2013. 10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthysubjects with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J Antimicrob Chemother* 68:562–568.
24. Nisha KV, Veena SA, Rathika SD, Vijaya SM, Avinash SK 2017. Antimicrobial susceptibility, risk factors and prevalence of bla cefotaximase, temoneira, and sulfhydryl variable genes among *Escherichia coli* in community-acquired pediatric urinary tract infection. *J Lab Physicians* 9: 156-162.
25. Poulou A, Grivakou E, Vrioni G, Koumaki V, Pittaras T, Pournaras S, Tsakris A 2014. Modified CLSI extended-spectrum-lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among *Enterobacteriaceae* producing various beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 52: 1483–1489.
26. Singh RM, Singh HL 2014. Comparative evaluation of six phenotypic methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Infect Dev Ctries* 8: 408-415.
27. Numanovic F, Hukic M, Delibegovic Z, Tihic N, Pasic S, Gegic M 2013. Comparison of double disk synergy test, VITEK 2 and Check- MDR CT102 for detection of ESBL producing isolates. *Acta Med Acad* 42:15-24.
28. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2269–2275.
29. Hayakawa K, Gattu S, Marchaim D, Bhargava A, Palla M, et al. 2013 Epidemiology and risk factors for isolation of *Escherichia coli* producing CTXM-type extended-spectrum b-lactamase in a large U.S. Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 4010–4018.
30. Xia S, Fan X, Huang Z, Xia L, Xiao M, Chen R, Xu Y, Zhuo C 2014. Dominance of CTX-M-Type Extended Spectrum *b*-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Isolated from Patients with Community-Onset and Hospital-Onset Infection in China. *Plos One* 9: e100707.

## 5 CONCLUSÃO

- *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* foram os uropatógenos mais frequentes causadores de infecções do trato urinário mais frequente em amostras de pacientes da comunidade;
- *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram alta frequência de ESBL em amostras da comunidade, sendo que em isolados de *K. pneumoniae* foi mais resistentes;
- Neste estudo foram encontrados fatores de risco como: idade e gênero. Enquanto que gravidez não foi fator de risco para isolados produtores de ESBL;
- Alta frequência de infecções recorrentes do trato urinário foi observada neste estudo;
- Isolados de *E. coli* produtores de ESBL apresentaram maior sensibilidade aos aminoglicosídeos, nitrofurantoína e carbapenêmicos. Em *K. pneumoniae* produtoras de ESBL houve maior sensibilidade à amicacina e carbapenêmicos;
- Dentre os teste fenotípicos utilizados neste estudo, o teste de Duplo Disco Sinergismo não apresentou um resultado satisfatório para detecção de isolados produtores de ESBL, enquanto que no teste em ágar ChromID<sup>®</sup> ESBL o resultado apresentou concordância com o Vitek<sup>®</sup>2;
- Entre os isolados produtores de ESBL houve maior frequência do gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, seguido de *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>. Dentre isolados com gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, foram mais frequentes os grupos *bla*<sub>CTX-M1</sub> e *bla*<sub>CTX-M9</sub>, em ambos microrganismos;
- Este estudo descreveu a incidência de ESBL entre isolados de *E.coli* e *K. pneumoniae* em isolados da comunidade e a disseminação do gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, sendo a mais frequente entre os produtores de ESBL.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Infecções do Trato Urinário e Outras Infecções do Sistema Urinário – Medidas de Prevenção de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. 2016.

AN BOECKEL, T.P. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **Lancet Infectious Diseases**, v. 14, p. 742–750, 2014.

ARLET, G., PHILIPPON, A. A. Construction of polymerase chain reaction and use of intragenic Dna probes for the main types of transferable Beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). **FEMS Microbiology Letters**, v. 66, p. 19-25, 1991.

ARNOLD, J.J., HEHN, L.E., KLEIN, D.A. Common questions about recurrent urinary tract infections in women. **American Family Physician Journal**, v. 93, p. 560–569, 2016.

BARTOLETTI, R. et al. Treatment of urinary tract infections and antibiotic stewardship. **European Urology Supplements**, v. 15, n. 4, p. 81–87, 2016.

BAUERNFEIND, A. et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infection**, v. 20, n. 3, p. 158-163, 1992.

BEDENIC, B. et al. Molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Zangred, Croatia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 20, p. 505-508, 2001.

BLANGO, M. G., MULVEY, M.A. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 1855-1863, 2010.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BRADFORD, P.A. et al. CTX-M-5, a Novel Cefotaxime-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase from an Outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 8, p. 1980-1984, 1998.

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

BUSH, K., JACOBY, G.A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

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

CHONG, Y., ITO, Y., KAMIMURA, T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1499-1504, 2011.

COQUE, T.M. et al. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 500-510, 2002.

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. 175-80, 2010.

CZAJA, C. A. et al. Population-based epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 3, p. 273-280, 2007.  
DJERIBI, R.B. et al. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **American Journal Infection Control**, v. 40, p. 854–859, 2012.

DASH, N. R., ALBATAINEH, M.T., ALHOURANI, N., KHOUDEIR, A.M., GHANIM, M., WASIM, M., MAHMOUD, I. Community-acquired urinary tract infections due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms in United Arab Emirates. **Travel medicine and infectious disease**, v.18, e30007-3, 2018.

DOI, Y. et al. Community-associated extended-spectrum betalactamase producing *Escherichia coli* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, p. 641–648, 2013.

EDELSBERG, J. et al. Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 3, p. 255-262, 2014.

FASUGBA, O. et al. Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 545, 2015.

FIORE, D.C., FOX, C.L. Urology and nephrology update: recurrent urinary tract infection. **FP Essentials**, v. 416, p. 30–37, 2014.

FLORES-MIRELES, A.L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, p. 269-84, 2015.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **American Journal of Medicine**, v. 113, n. 1, p. 5-13, 2002.

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

GHAFOURIAN, S. et al. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 17, n. 1, p. 11–22, 2015.

GHUYSEN, J. M. Serine-lactamases and penicillin-binding proteins. **Annual Review Microbiology**, v. 45, p. 37–67, 1991.

GUPTA, K.; TRAUTNER, B.W. Diagnosis and management of recurrent urinary tract infections in non-pregnant women. **British Medical Journal**, v. 346, p. f3140, 2013.

HEILBERG, I. P., SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário: ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 109-116, Jan. 2003.

HERITAGE, J. et al. Evolution and spread of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 309-318, 1999.

HOOTON, T.M. Uncomplicated urinary tract infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p.1028-1037, 2012.

HUANG, Z. M. et al. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v.2, p.5425–5427, 2004.

HUMENIUK, C. et al.  $\beta$ -Lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 3045-3049, 2002.

JACOBY, G.A., HAN, P. Detection of extended-spectrum Beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 908-911, 1996.

JARLIER, V. et al. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Review of Infectious Diseases**, v. 10, p. 867–878, 1988.

KNOTHE, H. et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

STÜRENBURG, E., MACK, D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **Journal of Infection**, v. 47, n. 4, p. 273-295, 2003.

ORREGO-MARIN, C.P.; HENAO-MEJIA, C. P., CARDONA-ARIAS, J.A.. Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. **Acta Médica Colombiana**, v. 39, n. 4, p. 352-358, 2014.

MILART, P. et al. Urinary tract infections in the menopausal period: optimal management. **Menopause Review - Przegląd Menopauzalny**, v.12, p. 23–28, 2013.

MINARDI, D. et al. Urinary Tract Infections in Women: Etiology and Treatment Options. **International Journal of General Medicine**, v. 4, p. 333–343, 2011.

MINARINI, L.A., GALES, A.C., PALAZZO, I.C., DARINI, A.L. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Current microbiology**. v, 54, n. 5, p. 355-41, 2007.

MORAES, D. et al. Prevalence of uropathogens and antimicrobial susceptibility profile in outpatient from Jataí-GO. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, n. 3, p. 200-204, Jun. 2014.

MULVEY, M. R. et al. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 358-65. 2005.

NAJAR, M. S., SALDANHA, C. L., BANDAY, K. A. Approach to urinary tract infections. **Indian Journal of Nephrology**, v. 20, n. 2, p. 129–139, 2010.

NASEER, U., SUNDSFJORD, A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, p. 83–97, 2011.

PADMINI, N. et al. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: critical tools for antibiotic resistance pattern. **Journal of Basic microbiology**, v. 57, p. 460-470, 2017.

PATERSON, D.L. et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3554-3560, 2003.

PÉREZ HERAS, I., SANCHEZ-GOMEZ, J.C., BENEYTO-MARTIN, P., RUANO-DE-PABLO, L., LOSADA-PINEDO, B. Community-onset extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in urinary tract infections in children from 2015 to 2016: Prevalence, risk factors, and resistances. **Medicine**, v, 96, n. 50, p. e8571, 2017.

PETERSON, D.L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American journal of infection control**, v. 34, n. 5, p. S20-S28, 2006.

PETERSON, D.L., BONOMO, R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Review**, v. 18, p. 657–686, 2005.

PITOUT, J.D.D., LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 159-166, 2008.

POIREL, L. et al. Molecular analysis of metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*SPM-1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1406-1409, 2004.

POWER, P. et al. Cefotaxime-hydrolysing beta lactamases in *Morganella morganii*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 743-747, 1999.

QUEIROZ, C.A., FELÍCIO, V.P.T. Infecções urinárias de origem bacteriana em pacientes atendidos em laboratórios de análises clínicas de Presidente Olegário-MG. **NewsLab**, v. 101, p. 106-11, 2010.

RASMUSSEN, J. W., HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 373-383, 2006.

ROCHA, F.R., PINTO, V.P.T., BARBOSA, F.C.B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301-311, 2016.

RODRIGUEZ-BANO, J. et al. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, p. 1897–1902, 2008.

RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H., GLUPCZYNSKI, Y. Emergence and dissemination of multi-resistant Gram negative *Enterobacteriaceae*: lessons to be learnt from local and national surveillance programs in Belgium. **Acta Clinica Belgica**, v. 70, n. 1, p. 1-10, 2015.

SANDERS, C. C., SANDERS, W.E. JR.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, p.824-839, 1992.

SANTANA, T.C.F.S. et al. Prevalência e resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos de primeira escolha nas infecções do trato urinário no município de São Luís-MA. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, 2012.

SCHNEEBERGER, C. et al. Interventions for preventing recurrent urinary tract infection during pregnancy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, 2012.

SHILO, S. et al. Risk factors for bacteriuria with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its impact on mortality: a case-control study. **Infection**, v. 41, p.503–509, 2013.

SILVERMAN, J.A. et al. From physiology to pharmacy: developments in the pathogenesis and treatment of recurrent urinary tract infections. **Current urology reports**, v. 14, n. 5, p. 448-456, 2013.

SORLOZANO, A. et al. Evolution of their resistance to antibiotic of involved in urinary tract infections: A 7-year surveillance study. **American Journal Infection Control**, v. 42, p. 1033-1038, 2014.

SUNDSTROM, L. The potential of integrons and connected programmed rearrangements for mediating horizontal gene transfer. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.84, p.37-42, 1998.

TAN, C. W., CHLEBICKI, M. P. Urinary tract infections in adults. **Singapore Medical Journal**, v. 57, n. 9, p. 485–490, 2016.

TERLIZZI, M.E., GRIBAUDO, G., MAFFEI, M.E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic and non-antibiotic antimicrobial strategies. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1566-86, 2017.

TURPEN, H.C. Frequent Urinary Tract Infection. **Physician Assistant Clinics**, v. 3, n. 1, p. 55-67, 2018.

VAN BRUMMEN, H.J. et al. How do the prevalences of urogenital symptoms change during pregnancy? **Neurourology and Urodynamics**, v. 25, n. 2, p. 135–139, 2006.

WAGENLEHNER, F.M.E. et al. Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens from hospitalised patients with urinary tract infections: 1994-2005. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. SUPPL. 1, p. 25–34, 2008.

WALSH, T.R. et al. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm?. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WILLIAMS, J. D.  $\beta$ -lactamase inhibition and *in vitro* activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p.494-497, 1997.

WOODFORD, N.; FAGAN, E.J.; ELLINGTON, M.J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154-155, 2005.

ZOWAWI, H.M. et al. The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. **Nature Reviews Urology**, v. 12, n. 10, p. 570, 2015.

## ANEXO I

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The Memórias' content is freely accessible to readers and no publication fees are charged to authors. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz has decided to simplify the requirements regarding the format of submitted manuscripts. From now on, all manuscripts may be submitted in any text format as long as the common subdivision of scientific articles are followed, e.g. introduction, materials and methods, results, discussion and references. For Reviews, Perspectives and similar articles, authors may use the sections that best suit the structure and content of the proposed manuscript. All manuscripts should contain, besides the title and abstract, full details of authors and institutions, acknowledgements of any technical or financial assistance as well as state any conflicts of interest. This flexible text format will be used for the initial analysis and peer review. If the manuscript is accepted, authors will be requested to edit the text in accordance with the publication style of the Memórias."

Upon acceptance, the manuscript should be arranged in the following format:

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references (must be up to 30 references), with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

Running title: not required

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Abstracts: Provide an abstract of between 250- 300 words (100 words in case of short communications, technical notes, genome announcements or reviews). Abstracts of original articles should be structured into 5 sections as follows: BACKGROUND, OBJECTIVES, METHODS, FINDINGS and MAIN CONCLUSIONS, each section addressing respectively the problem, the aim of the study, the main methodological approach, the most important findings and the conclusions of the study.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

In case of describing New Species, should follow:

Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov., (Figs x-y)

[Ex: *An. (Nyssorhynchus) atacamensis* González and Sallum, sp. nov. (Figs 1-4)]

Previous reference to the new species (when it is the case)

[Ex: *An. pictipennis* of Rueda et al. (2008): 448.]

Diagnosis (or Description; all stages are described);

Type host (when it is the case);

Site of Infection (when it is the case);

Type-locality;

Type data and depository;

Other material examined (when it is the case);

Distribution;

Host-parasite data (such prevalence and other important data, when it is the same case);

Bionomics;

Etymology;

Taxonomic discussion (or simply DISCUSSION as internal title).

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

Author's contribution: state each author's contribution to the work.

## REFERENCES

Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author. [CLICK HERE \[+\]](#)

### NUMBER OF REFERENCES MUST NOT EXCEED 30 CREATED IN WORD PROCESS

To assure your references is published as requested, please keep your list format up to 30 references and send archives without Mendeley Hyperlink or similar. References created with edition marks will cause improper corrections during editing process, causing delays.

### THE TITLE OF JOURNALS

Should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus.

Consult: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

In the text use authors' surname and date

Lutz (1910) or (Lutz 1910)

With two authors it is

(Lutz and Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912)

When there are more than two authors, only the first is mentioned

Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

### AT THE END OF THE PAPER USE THE FOLLOWING STYLES

#### Journal article

Chagas C, Villela E. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1922; 14(1): 05-61.

#### Book and Thesis

Forattini OP. Entomologia médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose. Vol. IV. São Paulo: Edgard Blucher; 1973. 658 pp.

Morel CM. Genes and antigens of parasites. A laboratory manual. 2nd ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1983. xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de

*Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae) [PhD Thesis]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2005. 85 pp.

#### Chapter in book

Cruz OG. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In: Ross R, The prevention of malaria. London: John Murray; 1911. 390-8.

#### Journal article on the Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [Internet]. 2002 [cited 2002 Aug 12]; 102(6). Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

#### Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph] [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

#### Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

#### Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>.

#### DATABASE ON THE INTERNET

##### Open database

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

##### Closed database

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome\\_title.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html).

##### Part of a database on the Internet

MeSH Browser [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002. Meta-analysis; 2003 [cited 2003 Jun 10]; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

## FIGURES AND TABLES MUST BE UNDERSTANDABLE WITHOUT REFERENCE TO THE TEXT

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Review: Papers in "review" format are accepted only by means of invitations made by the editor or associated editors.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be not divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Genome Announcement and Highlights: this section is dedicated to publish new genome information from eukaryote parasites, virus, bacteria and their respective vectors. Authors who wants a fast peer review and publication cycle for their research results covering new genome sequences, re-sequencing and comparative genome analysis as well as the expression pattern of genomes are invited to submitted papers under the short communication format.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying

the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

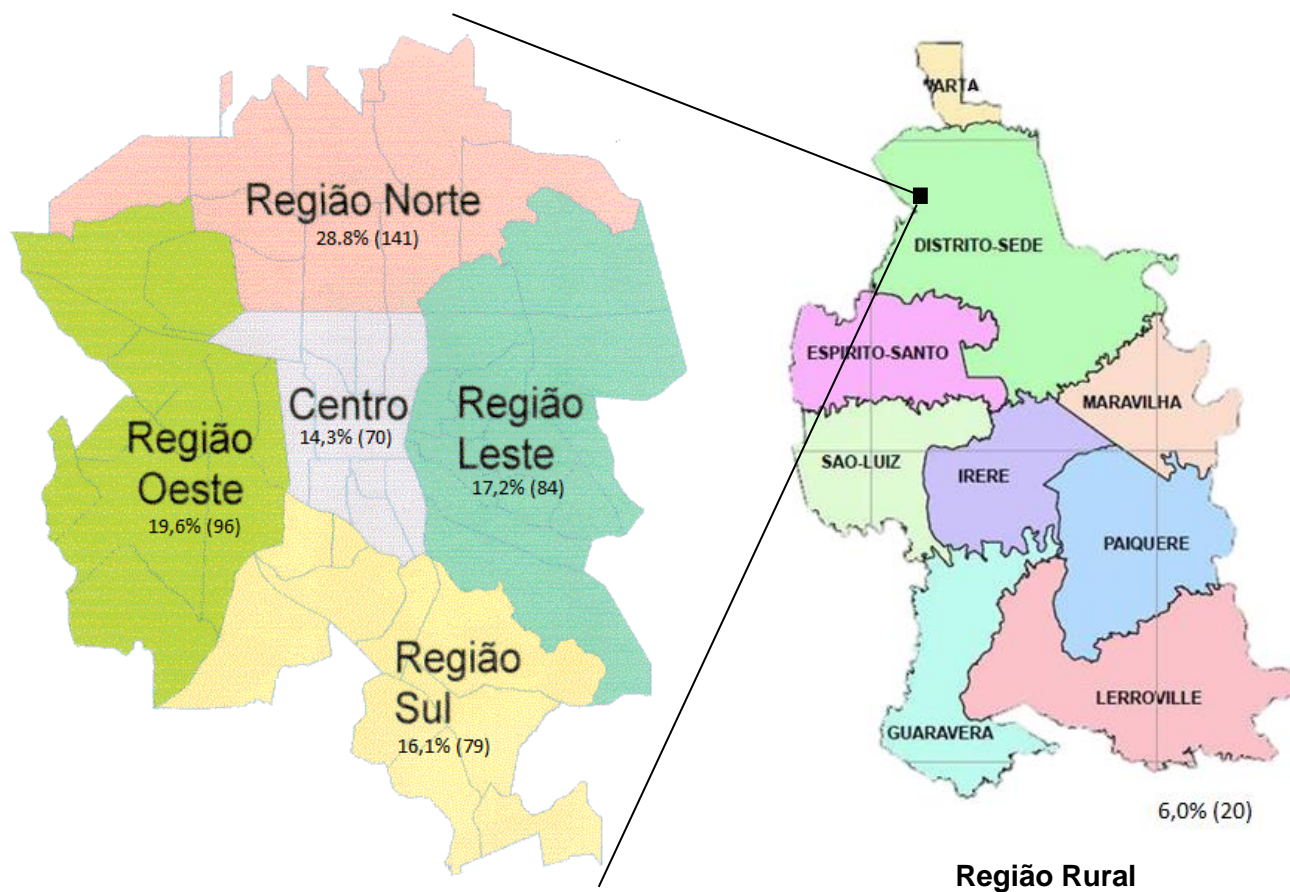
Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

## ANEXO II

**Figura 1.** Distribuição uropatógenos produtores de ESBL, no município de Londrina e distritos, no período de junho 2016 a maio 2017.



Fonte: adaptado de IPPUL (Instituto de Pesquisa e Planejamento Urbano de Londrina), 2014

### Anexo III

Distribuição dos genótipos *bla* encontrados entre as 488 uroculturas positivas para *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, de pacientes da comunidade, de junho de 2016 a maio de 2017.

Genes	Bactéria			
	E.coli (n=329)		K. pneumoniae (n=159)	
	Frequency	%	Frequency	%
TEM	4	1,2	7	4,5
SHV	8	2,4	1	0,6
CTX-M-1	95	28,8	44	27,7
CTX-M-2	15	4,5	3	1,9
CTX-M-8	1	0,4	1	0,6
CTX-M-9	45	13,7	18	11,4
CTX-M-25	1	0,4	3	1,9
TEM +SHV	12	3,6	1	0,6
TEM+SHV+ CTX-M-1	21	6,4	19	11,9
TEM+SHV+ CTX-M-1 + CTX-M-9	1	0,4	1	0,6
TEM+SHV+ CTX-M-1 + CTX-M-25	1	0,4	0	0,0
TEM+SHV+ CTX-M-2	6	1,8	0	0,0
TEM+SHV+ CTX-M-9	9	2,2	6	3,8
TEM+SHV+ CTX-M-9+ CTX-M-25	0	0,0	1	0,6
TEM+ CTX-M-1	24	7,3	18	11,4
TEM+ CTX-M-1 + CTX-M-9	0	0,0	1	0,6
TEM+ CTX-M-2 + CTX-M-9	1	0,4	0	0,0
TEM+ CTX-M-9	3	0,9	4	2,5
SHV+ CTX-M-1	24	7,3	5	3,2
SHV+ CTX-M-2	3	0,9	0	0,0
SHV+ CTX-M-2 + CTX-M-9	3	0,9	1	0,6
SHV+ CTX-M-25	0	0,0	1	0,6
SHV+ CTX-M-9	7	2,2	1	0,6
CTX-M-1 + CTX-M-2	4	1,2	1	0,6
CTX-M-1 + CTX-M-2 + CTX-M-9	1	0,4	0	0,0
CTX-M-1 +C25	1	0,4	0	0,0
CTX-M-1 + CTX-M-9	7	2,2	1	0,6
CTX-M-2 + CTX-M-8+ CTX-M-9+ CTX-M-25	0	0,0	1	0,6
CTX-M-2 + CTX-M-9	4	1,2	1	0,6
CTX-M-8+ CTX-M-9	0	0,0	1	0,6
NENHUM	28	8,5	18	11,4