



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DAS DOENÇAS
TROPICAIS

**INVESTIGAÇÃO DOS GENES *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M} PRODUTORAS DE
BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM *E. coli* e *Klebsiella spp*
ISOLADAS DE GESTANTES COM INFEÇÃO DO TRATO URINÁRIO
ATENDIDAS EM UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE DE IMPERATRIZ-MA**

ADRIANA DOS SANTOS OLIVEIRA

IMPERATRIZ – MA
2012

ADRIANA DOS SANTOS OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DOS GENES *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M} PRODUTORAS DE
BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM *E. coli* e *Klebsiella spp*
ISOLADAS DE GESTANTES COM INFEÇÃO DO TRATO URINÁRIO
ATENDIDAS EM UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE DE IMPERATRIZ-MA**

Dissertação de mestrado apresentada à banca examinadora do programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

**IMPERATRIZ – MA
2012**

Dados Internacionais de Catalogação -na- Publicação (CIP) -
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA

Oliveira, Adriana dos Santos.

Investigação dos genes *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM}, e *Bla*_{CTX-m} produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em *E. coli* e *Klebsiella spp* isoladas de gestantes com infecção do trato urinário atendidas em unidade básica de saúde de Imperatriz-MA / Adriana dos Santos Oliveira; orientadora, Edna Aoba Yassui Ishikawa. - 2012

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Aparelho urinário - Doenças. 2. Grávidas - Imperatriz (MA). 3. Beta-lactamases. I. Ishikawa, Edna Aoba Yassui, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ADRIANA DOS SANTOS OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO DOS GENES *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M} PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM *E. coli* e *Klebsiella spp* ISOLADAS DE GESTANTES COM INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO ATENDIDAS NA UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE DE IMPERATRIZ-MA

Dissertação de mestrado apresentada à banca examinadora do programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

Banca Examinadora

Prof^ª. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Orientadora – NMT/UFPA

Prof^ª Dra. Tereza Cristina de Oliveira Corvelo
Membro - NMT/UFPA

Prof^ª Dra. Marília Brasil Xavier
Membro - NMT/UFPA

Prof^ª Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro
Membro - NMT/UFPA

AGRADECIMENTOS

Neste primeiro momento gostaria de agradecer a Deus auto e consumidor de minha vida. Obrigada Senhor por mais esta conquista, pois sem Ele este sonho seria impossível.

Ao meu esposo Natal Dias Pinto Filho, pelo carinho, compressão e incentivo nos momentos difíceis.

Agradeço também a Deus por minha filha amada Nicole Pinto que nasceu durante este processo importante da minha vida, que e um sonho realizado.

A minha orientadora Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa, pelos ensinamentos, disponibilidade, compreensão nos momentos complicados que passei, incentivo, apoio, empenho, carinho e por compartilhar comigo seus conhecimentos, os meus mais sinceros agradecimentos, que Deus ilumine e abençoe sua vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da UFPA e aos professores pela disponibilidade e ousadia de enfrentar este desafio e repassar seus conhecimentos, muito obrigada a todos.

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

Aos meus amigos do Mestrado, pelas as amizades conquistadas, apoio e troca de experiências.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

RESUMO

As beta-lactamases são produzidas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. Cerca de 40% a 50% das mulheres desenvolveram uma infecção urinária durante a sua vida adulta. O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização dos genes *Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em *E. coli* e *Klebsiella spp* isoladas de gestante com infecção do trato urinário atendidas na Unidade Básica de Saúde de Imperatriz - MA no período de maio a agosto de 2012. Participaram do presente estudo 50 de mulheres grávidas maiores de 18 anos, que apresentaram sintomas com caracterização clínica de infecção do trato urinário (ITU), referenciadas no ambulatório na Unidade Básica de Saúde Imperatriz - MA. Foi coletada urina, para realização da urinocultura e antibiograma, posteriormente foi realizado a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) detectar a presença dos genes *Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}* produtores das enzimas Beta-lactamases. A média de idade destes pacientes foi de 21 anos, sendo 42% estando na faixa etária de 18 a 25 anos, 70% destas tem residência fixa em Imperatriz e os outros 30% são oriundos de outros municípios. Entre estas, 24% das voluntárias já apresentaram ITU durante a gravidez e fora do estado gravídico e 80% delas afirmaram fazer o uso de antibióticos sem prescrição médica. Das 12 amostras com crescimento microbiológico positivo, 11 foram positivas para *Escherichia coli* com resultados do antibiograma que apresentaram resistência para o antibiótico cefalotina, em 91,7%. Sendo isolado, uma cepa de *Klebsiella spp*, e esta apresentou resistência a todos os antibióticos testados. Pela análise dos resultados da PCR das amostras isoladas, os três genes *Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}*, não foram observadas nas amostras P9, P11 e P12, porém nas demais amostras houve a ocorrência de pelo menos um dos genes. Este estudo confirmou a presença dos três tipos de genes (*Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}*) entre as amostras estudada.

PALAVRAS-CHAVES: Beta-lactamases, infecção do trato urinário e gestante.

ABSTRACT

Beta-lactamases are produced by gram-positive and gram-negative bacteria. About 40% to 50% of women developed a urinary tract infection during their adult life. The aim of the present study was the characterization of genes *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M} beta-lactamase-producing extended-spectrum *E. coli* and *Klebsiella* spp isolated from pregnant women with urinary tract infection treated at a Basic Health Unit of Empress - MA from May to August 2012. The study included 50 pregnant women over 18 years who presented with symptoms clinical characterization of urinary tract infection (UTI), referenced in the clinic in the Basic Health Empress - MA. Urine was collected for urine culture and sensitivity of achievement, subsequently was performed Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect the presence of genes *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M}, enzymes producing beta-lactamases. The mean age of these patients was 21 years, 42% being aged 18 to 25 years, 70% of these fixed address in Empress and the other 30% come from other municipalities. Among these, 24% of the volunteers already had UTI during pregnancy and pregnancy out of state and 80% of them reported using antibiotics without prescription. Of the 12 samples with positive microbiological growth, 11 were positive for *Escherichia coli* with the antibiogram results that were resistant to the antibiotic cephalothin at 91.7%. Being isolated, a strain of *Klebsiella* spp, and this was resistant to all antibiotics tested. By analyzing the results of PCR samples isolated three genes *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M}, were not observed in samples P9, P11 and P12, but in the other samples was the occurrence of at least one of the genes. This study confirmed the presence of three types of genes (*Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M}) among the samples studied.

KEYWORDS: Beta-lactamases, urinary tract infection and pregnancy.

LISTA DE ABREVIATURAS

- FIGURA 1: Patogênese da ITU ocasionada por *E. coli* uropatogênicas, onde são ilustrados diferentes estágios da infecção 24
- FIGURA 2: Gene Bla CTX-M. Coluna 1: amostra P2; coluna 2: amostra P3; coluna3: amostra P4; coluna 4: amostra: P6; coluna 5: Marcador de peso molecular de 100pb; coluna 6 e 7: controle positivo e coluna 8: controle negativo 35

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1: Fatores que contribuem para as infecções do trato urinário provocado por bactérias.....	17
QUADRO 2: Adesinas comumente encontradas em amostras de <i>E. coli</i> Uropatogênicas-UPECs	22
QUADRO 3: Temperatura e Tempo utilizados na PCR para os primers dos genes	30
QUADRO 4- Primers usados para amplificar genes que codificam ESBL	30
QUADRO 5: Caracterização do perfil microbiológico e antibacteriano das cepas isoladas.....	33
QUADRO 6: Perfil de resistência entre as cepas isoladas para os antibióticos analisados.....	34
QUADRO 7: Caracterização dos genes de resistência para diferentes cepas isoladas	35
TABELA 1: Caracterização dos pacientes estudados	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESBLs- Beta-lactamases de espectro estendido

BA- Bacteriúruia assintomática

ITU- Infecção do trato urinário

LPS- Lipopolissacarídeos

MA- Maranhão

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards

NTEC- Fator Necrozante atotóxico

PCR- Reação em cadeia polymerase

RN- Recém-nascido

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

TSI- Triple Sugar Iron

UFC- Unidade formadoras de colônias

UPEC- *Escherichia coli* Uropatogênica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 REFERENCIAL TEÓRICO	15
4.1 PATOGENIA DA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO.....	15
4.2 PATOGENIA DA INFECÇÃO URINÁRIA NA MULHER GRÁVIDA	18
4.2.1 Patogenia da infecção bacteriana	19
4.2.1.1 Patogenia da <i>Escherichia coli</i>	21
4.2.1.2 Patogenia da <i>Klebsiella spp</i>	24
4.2.2 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)	25
5 METODOLOGIA	27
5.1 DESENHO DO ESTUDO	27
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	27
5.3 CRITÉRIO DE INCLUSÃO	27
5.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	27
5.5 MÉTODOS LABORATORIAIS.....	27
5.5.1 Urinocultura	27
5.5.2 Caracterização molecular das cepas bacterianas	28
5.5.3 Deteção dos genes ^{bla}_{tem}, ^{bla}_{shv} e ^{bla}_{ctx-m1}	29
6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	31
6.1 RISCOS E BENEFÍCIOS.....	31
7 RESULTADOS	32
8 DISCUSSÃO	36
9 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE	44
ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

As beta-lactamases são produzidas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-negativas apresentam um número extraordinário de beta-lactamases, sobretudo cromossomais e plasmidiais. (SOUSA, FERREIRA, CONCEIÇÃO, 2004). Dentre as bactérias gram-negativas, a produção de Beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência contra agentes beta-lactâmicos. (Sanders e Sanderes, 1992 *apud* DALMARCO, BLATT, CÓRDOVA, 2005). As beta-lactamases são enzimas capazes de clivar o anel beta-lactâmico muitas vezes importantes para o tratamento de doenças bacterianas. Geralmente, essas enzimas são codificadas por genes localizados em plasmídeos conjugativos, capazes de se replicar e disseminar entre as bactérias de diferentes espécies, assim como gêneros distintos. É por esse motivo que as beta-lactamases representam o principal mecanismo de resistência a Beta-lactâmicos em bactérias gram-negativas. (PICÃO E GALES, 2007).

Em 1983, um novo grupo de enzimas logo nomeadas de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi detectada em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* na Alemanha. (Knothe et al., 1983 *apud* DALMARCO BLATT, CÓRDOVA, 2005). Mais tarde, estas enzimas foram mapeadas e classificadas em dois grandes grupos, não relacionadas entre si, embora algumas enzimas dos dois grupos, ajam sobre o mesmo substrato (antibiótico beta-lactâmico), ligando-se a estes antibióticos em sítios complementares distintos. (Strenburg e Mack, 2003 *apud* DALMARCO, BLATT, CÓRDOVA, 2005).

A relação fundamental entre as enzimas ESBLs foi mais bem refletida pelo esquema de Amber, que é baseada na similaridade entre as sequências de aminoácidos. (Ambler et al., 1991 *apud* DALMARCO, BLATT, CÓRDOVA, 2005). Outro esquema de classificação utilizado é o modelo descrito por Bush-Jacoby-Medeiros, baseado no perfil do substrato, características físicas como peso molecular e ponto isoelétrico. (Bush K. et al. 1995; Bush K., 2001 *apud* DALMARCO, BLATT, CÓRDOVA, 2005)

As ESBLs são enzimas que conferem resistência principalmente as cefalosporinas de amplo espectro, como a Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima e ao monobactâmico Aztreonam. São produzidas, principalmente, por *Klebsiella sp.* e *E. coli* e a prevalência crescente destas amostras em hospitais e, em menor escala nas análises ambulatoriais, representando um impacto significativo nas prescrições de antibióticos. (SOARES et al., 2005).

A diferença de resistência das ESBLs às cefalosporinas torna difícil a detecção desses microorganismos, ou seja, essas enzimas nem sempre produzem um fenótipo de resistência

detectável pelo critério interpretativo do método de disco de difusão proposto pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). (Honório et al., 2001 *apud* SOARES et al., 2005).

Como na maioria dos laboratórios de rotina, especialmente nos laboratórios de pequeno e médio porte do município de Imperatriz, em consequência das dificuldades das técnicas de detecção, a prevalência de beta-lactamases de espectro estendido geralmente subnotificada e permanece desconhecida. Desse modo, devido a alta prevalência das grávidas apresentarem ITUs com resistência aos antibióticos, sentimos a necessidade em conhecer, utilizando métodos de Biologia molecular, se genes relacionados a ESBL são encontrados entre as bactérias causadoras de infecção nessas mulheres.

2 JUSTIFICATIVA

A partir da observação da disseminação de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro amplo (ESBLs) em pacientes hospitalizados em todo mundo, sabendo que em nossa região não há estudos relativos à investigação laboratorial acurada com fenotipagem ou genotipagem a cerca da possível presença bactérias consideradas ESBLs, torna-se um fator de grande relevância a investigação e caracterização molecular das mesmas.

A presença das ESBLs em bactérias envolvidas em infecções do trato urinário de gestantes atendidas na Unidade de Saúde Básica Três Poderes em Imperatriz-MA, tem sido um grande desafio na aplicação da melhor terapia. O conhecimento da ocorrência de ESBLs entre amostras de infecções do trato urinário em gestantes é de fundamental importância para que o médico possa estabelecer uma antibioticoterapia adequada.

Embora seja utópico pôr fim à resistência bacteriana, o seu controle entre amostras hospitalares é indispensável à qualidade da assistência a saúde. O controle de resistência, por sua vez, depende diretamente da detecção do mecanismo de resistência e da implementação de uma política de uso racional dos antimicrobianos. Assim, o perfil epidemiológico das instituições deve ser estabelecido e utilizado para fundamentar os protocolos terapêuticos, principalmente entre os hospitais de pequeno porte e médio porte, onde a prevalência de cepas multirresistentes pode ainda ser baixa ou nula. (PICÃO e GALES, 2007)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a presença dos genes *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M}, produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em *E. coli* e *Klebsiella spp*, isoladas de gestante com infecção do trato urinário atendidas na Unidade Básica de Saúde de Imperatriz-MA no período de maio a agosto de 2012.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Detectar a presença dos genes *Bla*_{SHV}, *Bla*_{TEM} e *Bla*_{CTX-M}, através das técnicas de PCR, entre as bactérias isoladas das gestantes.

-Determinar a espécie bacteriana mais prevalente como produtora de ESBL entre as amostras estudadas.

-Observar o perfil de resistência antimicrobiana desses microorganismos.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 PATOGENIA DA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

As infecções do trato urinário são responsáveis por cerca de 7 milhões de consultas por ano e são causa ou fator complicador em cerca de 1 milhão de internações por ano nos Estados Unidos. Cerca de 40% a 50% das mulheres desenvolveram uma infecção urinária durante a sua vida adulta. Devido à sua prevalência e potencial morbidade, deve ser plenamente conhecida pelos médicos. (VERONESI, 2005).

O trato urinário é estéril, com exceção do meato e uretra distal. Estas regiões são colonizadas por estafilococos, difteróides e outros microorganismos comensais. A urina é um meio de cultura que sofre variações. Sabe-se que concentrações altas de uréia, pH baixo, hipertonidade e a presença de ácidos orgânicos são desfavoráveis ao crescimento das bactérias. (VERONESI, 2005).

A bexiga possui mecanismos de defesa para eliminar as bactérias que atingiram o órgão. A peristalse uretral facilita o fluxo de urina do rim para bexiga, sendo a eficácia do esvaziamento vesical mantida pela ação competente da válvula vesico-uretral, que impede a ascensão da urina contaminada para ureteres, durante a micção. O esvaziamento vesical, através da micção, associado às propriedades antibacterianas da mucosa vesical, impedem a fixação bacteriana. Além disso, a mucosa vaginal é colonizada por lactobacilos que competem com a flora patogênica. (STAMM, LUCIANO e PERREIRA, 1997).

Infecção do Trato Urinário (ITU) é definida como a invasão de microorganismos, geralmente bactérias, para as vias urinárias, desde a bexiga até os rins, incluindo a próstata. De acordo com o segmento afetado, poder ser dividida em duas categorias anatômicas: infecção das vias urinárias inferiores (uretrite, cistite e prostatite), e infecção do trato urinário superior (pielonefrite e abscessos intrarenais e perinefréticos). (STAMM, LUCIANO e PERREIRA, 1997).

Em condições normais, há competição entre esses uropatógenos e a flora vaginal, constituídas principalmente por lactobacilos. A colonização da vagina é facilitada, principalmente, pelo uso de antibióticos e pela má higiene perineal. A migração para uretra e bexiga é desencadeada, principalmente, pela atividade sexual, pelo uso de contraceptivos com espermicida, e pela alteração do pH vaginal, que pode ocorrer com alteração da flora pelo uso de antibióticos e pelo hipoestrogenismo que, habitualmente, ocorre na menopausa. (SCHOOLNIK, 1989)

De acordo com Brasil (2004), como destacado pelo Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção nos Serviços de Saúde, existem três possibilidades de um microrganismo alcançar o trato urinário e causar infecção são: Via ascendente onde o microrganismo poderá atingir através da uretra, a bexiga, ureter e o rim. Esta via é a mais freqüente, principalmente em mulheres (pela menor extensão da uretra) e em pacientes submetidos à instrumentação do trato urinário. Via hematogênica onde ocorre devido à intensa vascularização do rim podendo o mesmo ser comprometido em qualquer infecção sistêmica; é a via de eleição para ITU(s) por alguns microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma* spp., sendo também a principal via das ITU(s) em neonatos. Via linfática onde é rara embora haja a possibilidade de microrganismos alcançarem o rim pelas conexões linfáticas entre o intestino e o rim e/ou entre o trato urinário inferior e superior.

A ascensão dos microorganismos no interior da uretra, a partir de fontes externas, constitui-se a via mais comum, especialmente para bactérias de origem entérica, como E.coli e outras enterobactérias. (STAMM, LUCIANO e PERREIRA, 1997).

O fato da infecção do trato urinário ser mais comum em mulheres do que em homens evidencia a importância da rota ascendente, visto que a uretra feminina é mais curta e está mais próxima a área densamente colonizada como a região perianal e vulvar. (VERONESI, 2005)

De acordo com Heilberg e Schor (2003) a ITU é classificada como *não* complicada quando ocorre em paciente com estrutura e função do trato urinário normal e é adquirida fora de ambiente hospitalar. As condições que se associam à ITU complicada incluem as de causa obstrutiva (hipertrofia benigna de próstata, tumores, urolitíase, estenose de junção uretero-piélica, corpos estranhos, etc); anátomofuncionais (bexiga neurogênica, refluxo vesico-ureteral, rim-espongiomedular, nefrocalcinose, cistos renais, divertículos vesicais); metabólicas (insuficiência renal, diabetes mellitus, transplante renal); uso de catéter de demora ou qualquer tipo de instrumentação ; derivações ileais.

De acordo com Brasil (2004), como destacado pelo Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção nos Serviços de Saúde, afirma também quanto á presença de fatores predisponentes ou agravantes as ITUs são classificadas em dois grupos: a ITU não complicada: ocorre primariamente em mulheres jovens sexualmente ativas sem anormalidade anatômica ou funcional do aparelho geniturinário. E a ITU complicada: ocorre em indivíduos que já possuem alguma anormalidade estrutural ou funcional do processo de diurese, presença de cálculos renais ou prostáticos, doenças subjacentes em que haja predisposição a infecção

renal (diabetes melittus, anemia falciforme, doença policística renal, transplante renal) ou na vigência de cateterismo vesical, instrumentação ou procedimentos cirúrgicos do trato urinário. Pelo maior risco, as ITUs em crianças, gestantes, homens e infecções do trato urinário alto são consideradas infecções complicadas.

Mulheres cujas mães têm história de ITU apresentam um risco de duas a quatro vezes maior de ter infecções de repetição. Esses achados sugerem que fatores intrínsecos podem ser importantes para algumas mulheres. Kallenius e Winberg demonstraram que as células periuretrais de pacientes com infecção de repetição eram mais susceptíveis à adesão bacteriana. (VERONESI, 2005).

As uretrites caracterizam-se por sintomas progressivos decorrentes da extensão do processo inflamatório na uretra no sentido distal proximal. A passagem da urina acentua estes sintomas, sendo a disúria sinal característico desta infecção. (VERONESI, 2005).

De acordo com Konemam 2008, as infecções das vias urinárias superiores são comumente ascendentes, isto é, origina-se na bexiga urinária e ascendem pelos ureteres para os rins. Normalmente, a válvula vesicouretral impede o refluxo da urina da bexiga para os ureteres. As pessoas com anomalias urogenitais, ou com hiperdistensão da bexiga urinária por obstrução de efluxo, disfunções neurogênicas ou pressão de um útero aumentado durante a gestação são particularmente susceptíveis a infecção ascendentes de vias urinárias. O resumo destes fatores que contribuem para infecções do trato urinário provocado por bactérias pode ser observado no Quadro 1 a seguir.

QUADRO 1: Fatores que contribuem para as infecções do trato urinário provocado por bactérias

Infecções ascendentes
Obstrução (por exemplo, por cálculos) em qualquer ponto do trato urinário.
Funcionamento anômalo da bexiga que impede um esvaziamento apropriado, tal como acontece nas doenças neurológicas.
Permeabilidade da válvula entre o ureter e a bexiga, permitindo que a urina e as bactérias fluam para trás da bexiga, alcançando possivelmente os rins.
Inserção de um cateter urinário ou de um instrumento, realizada por um médico
Infecções do sangue observadas no nascimento
Infecção na corrente sanguínea (septicemia).
Infecção das válvulas cardíacas (endocardite infecciosa).

Fonte: Manual Merck (2012)

Segundo Konemam (2008), afirma que as infecções da pelve renal (pielite) e rins (pielonefrite) são as complicações mais comuns. As infecções podem ser agudas ou recorrentes com dano inflamatório crônico. As infecções de vias urinárias superiores resultam menos comumente de dispersão hematogênica de bactérias para o córtex renal em pacientes com septicemia. Os abscessos multifocais ou a pielonefrite supurativa aguda são manifestações comuns. A cistite e pielonefrite em homens, crianças, pacientes cronicamente cateterizados e mulheres com infecção recorrente, anomalias neurológicas ou doença subjacente é considerada uma infecção complicada.

A cistite é uma inflamação comum da bexiga urinária em mulheres. Os sintomas frequentemente incluem disúria (micção difícil, dolorosa, urgente) e piúria (a presença de leucócitos na urina). Em 25% dos casos não-tratados, a cistite pode progredir para pielonefrite, uma inflamação de um dos rins ou ambos. Os sintomas são febre e dor no flancor ou lombar (TORTORA, 2003).

4.2 PATOGENIA DA INFECÇÃO URINÁRIA NA MULHER GRÁVIDA

Duarte (2004) afirma que, ITU entende-se como a presença e replicação de bactérias no trato urinário, provocando danos aos tecidos do sistema urinário. No entanto, durante a gravidez, o entendimento desta definição deve ser ampliado, considerando-se os riscos potenciais de complicações decorrentes da bacteriúria assintomática (BA).

Como existem dificuldades para o diagnóstico diferencial da ITU oligosintomática em gestantes, a quantificação de colônias bacterianas/mL de urina cultivada maior que 10^5 continua sendo o padrão para confirmação desse diagnóstico. Entretanto, existem situações nas quais estas definições precisam ser avaliadas de forma diferenciada, a exemplo das infecções sintomáticas com piúria, nas quais o encontro de 10^2 colônias/mL de urina cultivada confirma o diagnóstico. Para os casos de punção vesical, qualquer quantidade de colônias é suficiente para confirmar a suspeita diagnóstica. Para o diagnóstico de BA, necessita-se a contagem de 10^5 colônias bacterianas/mL de urina em cultivos de duas amostras urinárias distintas, para evitar os resultados falsos-positivos, que podem chegar a 40% quando baseados em uma única urocultura. (MACLEAN, 2001).

As mudanças anatômicas e fisiológicas impostas ao trato urinário pela gravidez predis põem a transformação de mulheres bacteriúrias assintomáticas em gestantes com ITU sintomáticas, deixando a impressão de que o número de infecções urinárias seja maior neste período da vida. (NOWICKI, 2002).

Dentre estas alterações, sobressai a dilatação do sistema coletor (compressão extrínseca pelo útero gravídico e pelo complexo vascular ovariano dilatado ao nível do infundíbulo pélvico; hipertrofia da musculatura longitudinal no terço inferior do ureter; e redução da atividade peristáltica decorrente da progesterona) e o aumento do débito urinário. A associação destes fatores à redução do tônus vesical favorece a estase urinária e o refluxo vésico-ureteral, transformando as infecções assintomáticas em sintomáticas. (GILSTRAP; RAMIN, 2001)

4.2.1 Patogenia da Infecção Bacteriana

A etiologia da ITU apresenta variações com sexo, idade, estado geral, uso prévio de antibióticos e aquisição dentro ou fora do ambiente hospitalar. (SOBEL, 1991)

A maioria das infecções é causada por aeróbios facultativos, que em geral originam-se da flora intestinal. A *Escherichia coli* é o agente mais freqüente, sendo responsável por 80 a 85% das infecções urinárias comunitárias. São também encontrados a *Klebsiella sp*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* entre outros. (STAMM, LUCIANO e PEREIRA, 1997).

Para que a infecção aconteça, as bactérias devem ter acesso à bexiga, fixa-se e colonizar o epitélio do trato urinário para evitar serem depuradas com a micção, fugir dos mecanismos de defesa e iniciar a inflamação. Muitas ITUs resultam de microorganismos fecais que ascendem a partir do períneo até a uretra e bexiga, aderindo, depois às superfícies da mucosa. (BRUNNER e SUDADARTH, 2005).

Segundo Veronesi (2005), defini-se fator de virulência como estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para que os microorganismos consigam se instalar e estabelecer a relação de parasitismo. A adesão, a invasão, a permanência do microorganismo no organismo do parasitado e a eventual produção de substâncias tóxicas que lesam células, tecidos ou órgãos do hospedeiro, compõem a maior parte dos chamados fatores de virulência.

A Adesão é a estratégia que as bactérias usam para fixar nas células e tecidos do organismo. A capacidade de aderir de maneira firme é mediada por estruturas da superfície da célula bacteriana, definidas coletivamente como adesinas. As adesinas por sua vez, somente funcionam quando interagem com receptores existentes no organismo. De modo geral os receptores estão localizados na superfície da célula ou são proteínas da matriz extracelular. (TRABULSI, 2008).

Veronesi, (2005) afirma que as fimbrias ou pili, estruturas filamentosas de natureza protéica que recobrem toda a superfície da bactéria, funcionam como adesinas de bactérias

gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Vibrio cholerae*, e algumas gram positivas como *Bacillus*. Embora não se conheça a composição química de todas as fimbrias, é possível que na superfície das células ou tecidos haja receptores que permitam a interação da fimbrias com as respectivas células. Outras bactérias desprovidas de fimbrias têm receptores na parede celular através de suas macromoléculas, como lipopolissacarídeos (LPS) ou ácidos teicóicos.

A invasão permite que os microorganismos fiquem num determinado local e lá exerçam suas atividades de crescimento e multiplicação, podendo competir pelos nutrientes e, com isto lesar o organismo parasitado. Alguns microorganismos produzem Hemolisinas (fator de virulência) que rompem hemácias e liberam ferro. Outro aspecto ligado a invasão coloca novamente em disputa as defesas do organismo e a capacidade agressora dos patógenos. (VERONESI, 2005).

A fagocitose outro mecanismo de invasão, é um mecanismo de defesa para o qual existem células especializadas que estão constantemente exercendo o papel de limpeza e remoção de microorganismos e restos celulares. Após a ingestão/fagocitose, os microorganismos são mortos ou degradados, sendo os seus componentes apresentados ou não às células do sistema imunológico. (VERONESI, 2005).

Segundo Trabulsi (2008), o termo toxina tem sido usado para designar qualquer substância de origem microbiana capaz de causar danos ao organismo animal. As toxinas bacterianas podem ser classificadas em endotoxinas e exotoxinas. A endotoxinas mais estudada corresponde ao lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa da *Escherichia coli* e de outros membros da família Enterobacteriaceae. A molécula do LPS compreende três partes: lipídeo A, cerne e antígeno O.

De acordo com Veronesi (2005), as exotoxinas são divididas em três tipos de acordo com suas interações com as células do hospedeiro. As do tipo I são toxinas que atuam na superfície das células e podemos citar os superantígenos que se ligam diretamente a receptores na superfície de linfócitos T e as toxinas ST (termoestáveis) de *E. coli*. As exotoxinas do tipo II lesam a membrana citoplasmática formando poros, exemplo são as Hemolisinas. As exotoxinas do tipo III são numerosas, são formadas por duas subunidades designadas A e B. A subunidade B serve como receptora, pois é por meio dela que a toxina liga-se à célula alvo, e a subunidade A é a que entra na célula e provoca efeito biológico. Definimos como evasinas alguns fatores de virulência e principalmente estratégias usadas pelas bactérias para contornar ou vencer as defesas inatas e adquirida do organismo, situadas

abaixo da pele e mucosas. Estas defesas são representadas pela fagocitose, complemento, citosinas, linfócitos citotóxicos e anticorpos. (TRABULSI, 2008)

Segundo Heilbreg e Schor (2003), relatam que as enterobactérias se caracterizam pela presença ou não das seguintes estruturas: a) *flagelo* ou *antígeno “H”*, responsável pela motilidade da bactéria; b) *cápsula* ou *antígeno “K”*, que confere resistência à fagocitose; c) *polissacarídeos* ou *antígeno “O”* sempre presentes na membrana externa da bactéria, que são determinantes antigênicos de anticorpos específicos sendo, portanto, úteis na tipagem sorológica (150 *antígenos “O”* definidos) e na discriminação entre relapso e reinfecção; d) *fímbrias* ou *pili* ou *adesinas*, responsáveis pela adesão da bactéria ao urotélio e transmissão de informação genética a outras bactérias via DNA dos plasmídeos. Existem dois tipos de pili: tipo I (manose-sensível) cujos receptores são a manose ou a proteína de Tamm-Horsfall e tipo 2 (manose-resistente) cujo receptor é parte de um glicosíngolípide (*Gal-Gal*). Os fagócitos do hospedeiro, incluindo polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos, reconhecem os pili tipo I e são capazes de fagocitar e matar a bactéria na ausência de anticorpo específico. É possível que anticorpos contra pili tipo I diminuam a resistência à infecção e é por esta razão que este antígeno não deve ser incorporado a uma eventual vacina. Bactérias que possuem pili tipo II aderem ao urotélio e também a antígenos do grupo sanguíneo tipo P. Isto se deve à presença de antígenos do grupo sanguíneo P na superfície de uroepitélio. Devido à similaridade antigênica entre bactérias gram-negativas e este ou outros grupos sanguíneos (Lewis, ABO), a determinação de fenótipos relacionados aos grupos sanguíneos serve como marcação de populações com risco de desenvolverem ITU de repetição.

4.2.1.1 Patogenia da *Escherichia coli*

Escherichia coli Uropatogênica (UPEC) é o principal agente que ocasiona infecções no trato urinário (ITU), além de ser uma das fontes mais comuns de bacteremia em indivíduos hospitalizados. (PIRES et al, 2007)

Diversas linhagens de *Escherichia coli* patogênica ou comensais são capazes de colonizar superfícies pela expressão de estruturas de adesão como flagelo, pili conjugativo, polissacarídeos extracelulares e curli, formando o biofilme bacteriano. (CASTONGUAY et al, 2006)

As UPECs compreendem muitos sorotipos, mas em torno de 75% deles pertencem a somente seis sorogrupos “O” denominados: O1, O4, O6, O16, O18, O25. As frequências destes sorogrupos podem variar. (TRABULSI, 2008).

Enquanto a adesão mediada pela fímbria do tipo 1 é importante durante os estágios iniciais de colonização, a motilidade e quimiotaxia do flagelo bacteriano permitem que a UPEC se dissemine para novos sítios do trato urinário, tanto para obter nutrientes quando estes se tornam limitados, quanto para escapar da resposta imune do hospedeiro. (PIRES et al, 2007)

Segundo Trabulsi (2008), as adesinas constituem os principais fatores de virulência da UPEC, pois permitem adesão e invasão bacteriana nas células do trato urinário. As adesinas podem ser fimbrias ou não, sendo as duas adesinas fimbriais mais importantes tipo 1 e fimbria P. A fimbria do tipo I é codificada pelo gene *fim I* e tida como um dos principais fatores de virulência da UPEC. O componente responsável pela ligação da bactéria a uma variedade de receptores formados por glicoproteínas, contendo manose, é uma subunidade da fimbria tipo I chamada Fim H. As interações bacterianas mediadas por Fim H com as células uroepiteliais são críticas para a capacidade das UPECs de colonizar a bexiga e causar doença.

A adesina das estirpes que infectam os rins é a fímbria P, que está associada às pielonefrites (CHEN *et al.*, 2003)

Hemolisinas são citotoxinas (HlyA) que conduzem a uma lise osmótica principalmente de eritrócitos (TRABULSI; CAMPOS, 1999).

E. coli Uropatogênica podem apresentar a habilidade de adquirir ferro, utilizando sideróforos, exoproteínas codificadas pelo gene *aer* plasmidiais. (SAYLERS; WHITT, 1994). As adesinas mais comumente encontradas em *Escherichia coli* Uropatogênica podem ser observadas no Quadro 2 abaixo.

QUADRO 2: Adesinas comumente encontradas em amostras de *E coli* Uropatogênica-UPECs

Organela	Adesinas	Receptores	Reconhecimento celular	Doenças associadas
Fímbria tipo 1	FimH	Glicoproteínas contendo manose (Ex.: UP1a e CD48), proteína Tamm-Hosfall, colágenos tipos I e IV, laminina, fibronectina	Células epiteliais da bexiga e dos rins, eritrócitos, mastócitos, macrófagos, neutrófilos, matriz extracelular, implantes	Cistite, sepse, meningite
Fímbria P	PapG (I, II, III)	GbO3, GbO4, GbO5	Células epiteliais dos rins, eritrócitos	Pielonefrite
Fímbria S/F1C	SfaS, SfaA/FocH	Resíduos de ácido siálico, plasminogênio, β -GalNac-1,4-Gal	Células epiteliais da bexiga e dos rins, eritrócitos, células endoteliais	Infecções ascendentes, sepse, meningite
Adesinas Dr	Várias	DAF (CD55), CD66e, colágeno tipo IV, integrina $\alpha_5\beta_1$	Células epiteliais da bexiga e dos rins, eritrócitos, neutrófilos, compartimentos intersticiais dos rins	Cistite, pielonefrite, diarreia, sepse

De acordo com Trabulsi (2008), a contribuição de antígenos O específicos (e possivelmente K e H) na virulência das UPECs ainda merece estudos, porém sabe-se que amostras de *E. coli* que causam UTI diferem das amostras fecais pela expressão de determinados antígenos O:K:H. Pode-se afirmar ainda que os polissacarídeos capsulares (K) recobrem toda célula bacteriana interferindo com a detecção do antígeno O e protegendo-a dos mecanismos de defesa do hospedeiro, estes antígenos capsulares bloqueiam a opsonização da bactéria por interferirem com a deposição do complemento, contribuindo para resistência ao soro e impedindo a fagocitose bacteriana.

O fator necrotizante citotóxico (NTEC) está associado com infecções extraintestinais (septicemia e infecção do trato urinário) e enterites no homem e animais (SEARS; KAPER, 1996).

De acordo com Trabulsi (2008), a patogenia da UPECs ocorre a partir da migração da *E. coli* dos intestinos para regiões periuretrais. Elas entram pela uretra, sobem para bexiga e aderem ao epitélio vesical através da fimbrias tipo I e P que reconhecem seus respectivos receptores. Após a adesão, ocorre a invasão, multiplicação intracelular, apoptose e esfoliação das células infectadas. Alguns estudos sugerem que algumas células não sofrem esfoliação, permanecendo infectadas com as UPECs em estado de dormência. Estas células poderiam ser causa de infecções recorrentes. A partir da bexiga a UPEC pode ganhar os ureteres e chegar aos rins onde adere ao epitélio renal principalmente através da fimbria do tipo P. Segue-se a adesão, produção de toxinas que lesam os glomérulos. Eventualmente, a UPEC pode atravessar o epitélio e cair na corrente sanguínea. A reação inflamatória, freqüentemente intensa, é mediada por citocinas, cuja produção é induzida pelo antígeno O, Hemolisinas e provavelmente por outros fatores de virulência. Baseado na seqüência de promoção e ascendência da UPECs pode observar o mecanismo de patogenicidade da UPECs no trato

urinário nos seus diversos estágios de ocorrência que pode ser observado na Figura 1 abaixo.

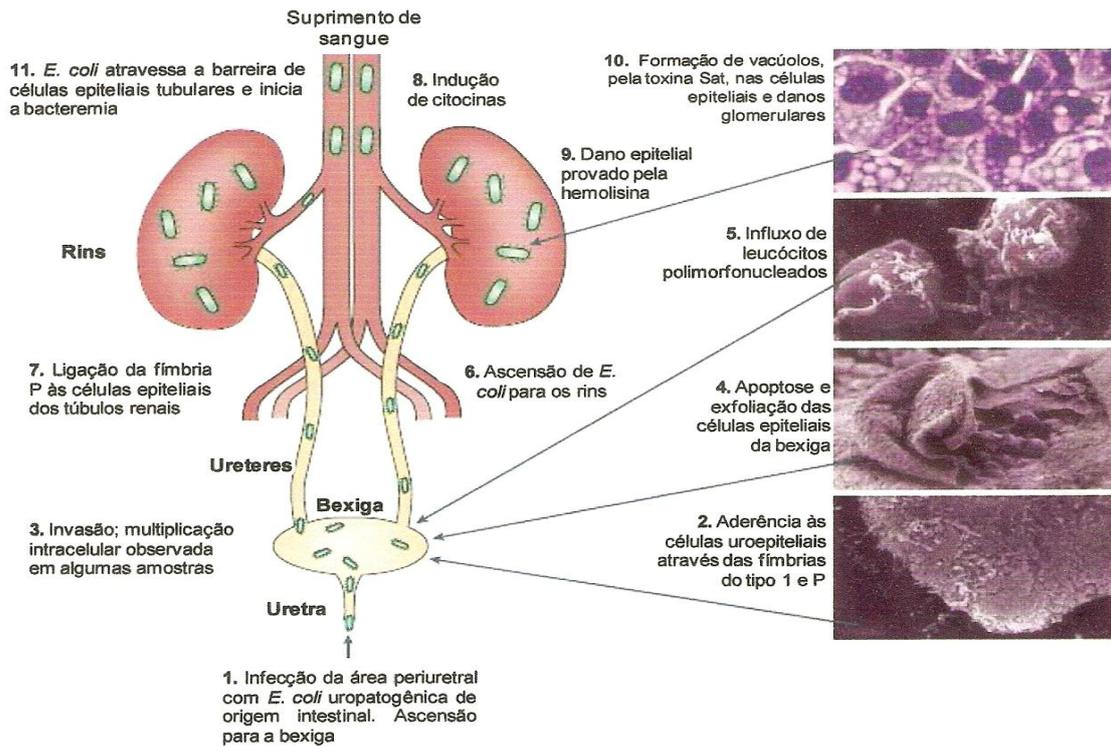


Figura 1. Patogênese da infecção do trato urinário ocasionada por *E. coli* uropatogênica, onde são ilustrados os diferentes estágios da infecção (adaptado de Kaper *et al.*, 2004).

4.2.1.2 Patogenia da *Klebsiella spp*

Segundo Trabulsi (2005), o gênero *Klebsiella* faz parte da família *Enterobacteriaceae* e possui três espécies, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*. A espécie mais isolada é *K. pneumoniae*. É encontrada nas fezes de 30% dos indivíduos normais e, em menor frequência, na nasofaringe. É uma bactéria com relevância crescente nas infecções hospitalares e na condição de patógeno oportunista, frequentemente causa infecções em pacientes imunocomprometidos. Neste sentido, as populações de maior risco incluem os recém-nascidos (RN), pacientes cirúrgicos, portadores de neoplasias e diabetes. Já a espécie *K. pneumoniae* tem facilidade para colonizar as mucosas, infecções por esta espécie comprometem principalmente, o trato urinário e o trato respiratório.

De acordo com Konemam (2008), as Klebsiellae têm tendência a abrigar plasmídios de resistência a antibióticos; por conseguinte é possível antecipar a ocorrência de infecções por cepas resistentes a múltiplos antibióticos.

A patogenicidade da *Klebsiella* spp. pode ser atribuída à produção de enterotoxina estável ao calor; à habilidade de metabolizar a lactose; à presença de cápsula ou lipopolissacarídeo; à presença de adesinas com ou sem fímbrias que favorece sua adesão às mucosas, às células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para produzir o processo infeccioso e proteger a bactéria dos fatores bactericidas do soro acompanhado pela inibição da ativação dos componentes do complemento. A maioria dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* é encapsulada e adere *in vitro* a células intestinais com padrão agregativo. Estudos observaram que *K. pneumoniae* produtoras de ESBL do tipo SHV-4, possuem adesinas fimbriais do tipo KPF-28 (MADSON et al, 1994)

A habilidade das *K. pneumoniae* produtoras de ESBL de escapar da atividade fagocítica dos polimorfonucleares neutrófilos pode ser responsável pelo grande potencial patogênico destas bactérias.(SAHLY et al, 2002).

4.2.2 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

Em 1983, um novo grupo de enzimas logo nomeadas de Beta-lactamases de espectro estendido (*ESBLs*) foi detectado em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* na Alemanha (KNOTHE *et al.*, 1983).

Mais tarde, estas enzimas foram mapeadas e classificadas em dois grandes grupos, não relacionados entre si, embora algumas enzimas dos dois grupos ajam sobre o mesmo substrato (antibiótico beta-lactâmico), ligando-se a estes antibióticos em sítios completamente distintos. Este grupo de enzimas foi primeiramente referido como resultado de genes presentes em plasmídeos, como o TEM-1, TEM-2 e SHV1, os quais sofreram mutações semelhantes, resultando em substituições no aminoácido terminal e no sítio ativo destas enzimas. Estas alterações (mutações) causam modificações estruturais no sítio ativo, causando acréscimo de sua ação sobre as cefalosporinas. Como resultado, sua ação não se restringe apenas às penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração mas, também, sobre as oxiaminocefalosporinas (Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona) e monobactams (Aztreonam). (STÜRENBURG e MACK, 2003).

As ESBLs estão inseridas em dois principais esquemas de classificação das Beta-lactamases: a classificação molecular de Ambler (1991) e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros. (Oliveira, C. F., 2009 *apud* BUSH, 1995). O esquema de Ambler divide as Beta-lactamases em quatro classes maiores (A a D). A base de esquema de classificação reside sobre a homologia protéica (similaridade de aminoácidos) e não nas características

fenotípicas. A classificação de Bush-Jacoby-Medeiros usa as propriedades funcionais da enzima mais a estrutura molecular e a sequência de nucleotídeos dos genes para classificar as Beta-lactamases em grupos funcionais. (Oliveira, 2009 *apud* BRAFORD,2001; BUSH,1995).

O termo ESBL provavelmente signifique que estes beta-Lactamases do grupo 2be Bush-Jacoby, Medeiros e o grupo 2d compartilha a maioria das propriedades fundamentais da grupo 2be enzimas. O 2be mostra designação de que essas enzimas são derivadas do grupo 2b beta-lactamases (por exemplo, TEM-1, TEM-2, e SHV-1), e para o 2be denota que as beta-lactamases têm um espectro alargado. Grupo 2b tem enzimas que hidrolisam penicilina e ampicilina, e em uma menor intensidade carbenicilina ou cefalotina. (BUSH; JACOBY e MEDEIROS, 1995).

TEM-1 é a beta-lactamase mediada por plasmídeo mais comum dos bacilos gram-negativos entéricos resistentes à ampicilina (por exemplo, *E.coli*), enquanto SHV-1 é produzida pela vasta maioria de *Klebsiela pneumoniae*. (Oliveira, C. F., 2009 *apud* LIVERMORE, 1995).

5 METODOLOGIA

5.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente trabalho apresenta estudo descritivo tipo série de casos, envolvendo pacientes grávidas maiores de 18 anos com infecção urinária referenciada ao laboratório com diagnóstico provável de ITU no período de maio a agosto de 2012.

5.2 CARACTERIZAÇÕES DA AMOSTRA

Participaram do presente estudo 50 de mulheres grávidas maiores de 18 anos, que apresentaram sintomas com caracterização clínica de ITU (infecção do trato urinário), referenciadas no ambulatório da Unidade Básica Saúde em Imperatriz-MA e que foram atendidas pela equipe médica do ambulatório.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão abordados foram: mulher grávida em qualquer período gestacional que apresente infecção do trato urinário maiores de 18 anos, atendidas no ambulatório na Unidade Básica Saúde de Imperatriz - MA, no período de maio a agosto de 2012, e que aceitaram participar da pesquisa após a assinatura do TCLE.

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Mulheres gestantes, maiores de 18 anos, cujos prontuários estiverem incompletos, não fornecendo dados para o preenchimento adequado da ficha-protocolo.

5.5 MÉTODOS LABORATORIAIS

5.5.1 Urinocultura

- Técnica de coleta de urina (amostra biológica):

Foi colhido o jato médio após a limpeza dos genitais externos com água e sabão neutro, retirado o excesso de sabão com gaze úmida, foi aberto o frasco com cuidado para não tocar

o interior, desprezado o primeiro jato e coletado diretamente no frasco apropriado (estéril e de boca larga) a porção intermediária. O armazenamento da amostra de urina foi em temperatura ambiente até 2 horas após a coleta e depois disto armazenadas sob 20° C. O seu transporte foi realizado em caixas isotérmicas, com gelo reciclável, mantendo temperatura entre 13° C e 23,5°C.

- Semeadura e Isolamento (amostra biológica):

Após homogeneização da amostra de urina colhida, foi feito à microscopia do material através da realização da coloração de gram e posteriormente a isto o material foi semeado em placa de ágar MacConkey e ágar Cled, com alça calibrada 0,001 (1:1000) pela técnica de inoculação semiquantitativamente que constou inicialmente de uma estria central na superfície do ágar, seguido de um estriamento perpendicular á estria inicial. As placas semeadas foram incubadas por 18-24 horas a 35°C (+/- 2°), decorrido este tempo foi analisado as características das colônias no meio de cultura e feito a identificação através de provas bioquímicas, utilizando os meios de TSI (Triple Sugar Iron) e a série bioquímica (glicose, sacarose, lactose, motilidade, indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer, lisina, ornitina, uréia, fenilalanina, H₂S).

O número de UFC/mL foi dado pela contagem das colônias com as mesmas características na placa contendo o meio Agar Cled, multiplicado pelo fator de diluição (1000).

As cepas bacterianas foram submetidas à prova de suscetibilidade antimicrobiana pelo método da difusão do disco, onde discos especiais de papel de filtro com concentração padronizada dos antibióticos foram testados para o tipo de infecção que está em avaliação foram colocados sobre placa de ágar Mueller- Hinton, previamente semeado com uma suspensão padronizada do microorganismo. Após a inoculação as placas foram incubadas por 18 a 24h a temperatura de 37°C, o halo de inibição foi medido e interpretado como sensível ou resistente, de acordo com critérios estabelecidos no documento do NCCLS. Foi usado como controle de cepas *E.coli* e *K.pneumoniae* .

Os microorganismos isolados foram transportados ao laboratório da Universidade Federal do Pará onde foram realizados os testes moleculares.

5.5.2 Caracterização molecular das cepas bacterianas

Após a identificação, as bactérias foram lavadas com solução salina fosfatada (PBS 2,5 mM NaH₂PO₄; 7,4 mM Na₂HPO₄; 14,0 mM NaCl) por 3 vezes, sendo submetidas a

centrifugação de 5.000 rpm por 10 minutos. Após a última lavagem será adicionado ao sedimento solução de LISE (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM Tris, 1% SDS) e adicionadas proteinase K (numa concentração final de 50 µg/mL), seguida de incubação a 42°C durante 2 horas.

EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi obtido por meio de extração utilizando o fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), conforme Sambrook et al.(1989) e precipitado com 1/10 do seu volume pela adição de solução de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 2 ½ volumes de etanol absoluto gelado. O material foi mantido a -20°C por 8 horas ou mais, depois disto foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. Todo o sobrenadante foi desprezado e o sedimento seco, depois suspenso em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e mantido a 4°C até o momento do uso. Um microlitro (1µL) da amostra foi utilizado em cada reação de PCR.

5.5.3 Detecção dos genes ^{bla}tem, ^{bla}shv e ^{bla}ctx-m1

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Cada reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 2,5 U/µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, catálogo10966-030), 200 µM de cada dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, com 50 ng dos oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores) por reação e 1 µL de DNA extraído.

As reações em cadeia de polimerase foram realizadas em termociclador (Biocycler MJ-96G) sendo submetidas a 94°C por cinco minutos para a desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos nas seguintes condições de temperatura e tempo para cada par de primers descritos na tabela 01 e 72°C por 10 minutos para a extensão final.

QUADRO 03: Temperatura e tempo utilizados na PCR para os primers dos genes

	Gene ^{bla} TEM	Gene ^{bla} SHV	Gene ^{bla} CTX-M1
Desnaturação	94°C/1 minuto	94°C/1 minuto	94°C/1 minuto
Ligação	52°C/ 1 minuto	52°C/ 1 minuto	52°C/1 minuto
Extensão	72°C/1 minuto	72°C/1 minuto	72°C/1 minuto

Fonte: Produção pessoal

O produto da PCR foi fracionado em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (CONDA®-catalogo8012) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA). O fragmento amplificado de DNA foi corado com brometo de etídio em concentração final de 0,5 µg/ml e as bandas visualizadas em transluminador de UV. As imagens foram capturadas pelo fotodocumentador de géis (Vilber Loumart) para análises.

Os primers utilizados para amplificação foi dos genes que codificam β-lactamases, ^{bla}TEM, que amplifica fragmento de 867pb, ^{bla}SHV que amplifica 930pb e ^{bla}CTX-M1 que amplifica 544pb. Todos os marcadores foram produzidos pela Invitrogen® .

QUADRO 04: Primers usados para amplificar genes que codificam ESBL

Gene	Sequência (5' → 3')	Referência
^{bla} TEM	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGT TACCAATGCTTAATCA	JAIN, 2008
^{bla} SHV	GGGTTATTCTTATTTGTCGC TTAGCGTTGCCAGTCCTC	JAIN, 2008
^{bla} CTX-M1	TTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	EDELSTEIN, 2003

Fonte: Produção Pessoal

6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA (Anexo A). Previamente, todos os que participaram do estudo foram informado sobre a pesquisa, de maneira acessível e esclarecidos da importância do estudo, sendo solicitada a permissão, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), autorizando sua participação nesta pesquisa, possibilitando a coleta de material biológico.

6.1 RISCOS E BENEFÍCIOS

A participação nesse estudo trouxe riscos mínimos, referente à colheita da urina que foi realizada pela própria paciente com orientações específicas sobre o procedimento, seguindo todas as normas de biossegurança. Foi mantido o sigilo em todos os procedimentos, seguindo a ética profissional.

7 RESULTADOS

Na Tabela 1 trás a caracterização dos pacientes estudados, onde participaram deste estudo 50 mulheres voluntárias grávidas maiores de 18 anos com provável diagnóstico de ITU (infecção do trato urinário). A média de idade destes pacientes foi de 21 anos, sendo 42% com faixa etária de 18 a 25 anos.

TABELA 1: Caracterização dos pacientes estudados.

VARIÁVEIS	N (%)
Idade (anos)	
18-25	21 (42)
26-35	15 (30)
36-45	7 (14)
Acima de 46	7 (14)
Naturalidade	
Imperatriz	35 (70)
Outros municípios	15 (30)
Estado civil	
Casada e União estável	29 (58)
Solteira, divorciada e viúva	21 (42)
ITU(infecção do trato urinário) durante a gravidez e fora do período gravídico	
Nenhuma	
1 ITU	18 (36)
2 ITU	4 (8)
3 ITU	9 (18)
4 ou mais ITU	7 (14)
	12 (24)
Uso de antibióticos sem prescrição médica	
Sim	
Não	40 (80)
	10 (20)

Fonte: Dados da pesquisa

Dentre estas 50 voluntárias estudadas, 70% destas tem residência fixa em Imperatriz e os outros 30% são oriundos de outros municípios.

Baseado nos dados coletados a partir da população avaliada pode-se afirmar que 24% (12) das voluntárias avaliadas já apresentaram ITU durante a gravidez e fora do estado gravídico, sendo que estas notificaram que tiveram 4 ou mais ITU. Entretanto 36% (18) das voluntárias informaram que nunca desenvolveram ITU.

Quanto ao uso de antibióticos sem prescrição médica, 80% das entrevistadas afirmaram fazer o uso de antibióticos sem prescrição médica enquanto 20% das voluntárias afirmaram não ter esta conduta.

A identificação das cepas e antibiogramas analisados, representados no Quadro 5, demonstram resultados diferenciados entre as cepas isoladas, onde as 12 amostras com crescimento microbiológico positivo, destas 11 foram positivas para *Escherichia coli* com resultados do antibiograma apresentam significativa resistência para o antibiótico cefalotina de 91,7% das cepas analisadas. Foi isolado 1 cepa de *Klebsiella ssp* já para esta todos os antibióticos testados apresentaram resistência, sendo esta a bactéria que mais encontrou-se o perfil de resistência para os antibióticos analisados.

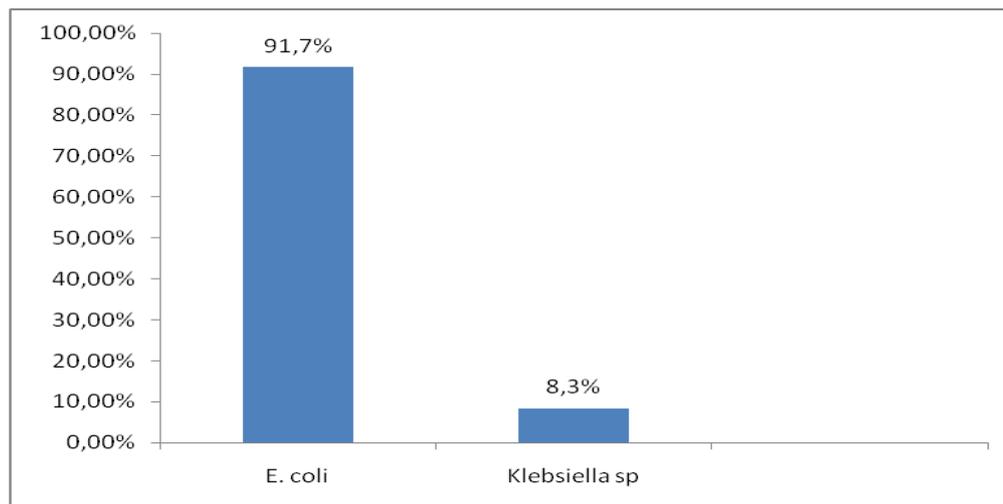
QUADRO 5: Caracterização do perfil microbiológico e antibacteriano das cepas isoladas

Paciente/ Antibióticos	AMP	CIP	COT	AMC	TET	AMI	CFL	GEN	CPM	CAZ	ATM	CLO	CRO	PEP	CEF	CFO	BACTÉRIA ISOLADA
P1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	NT	<i>E. coli</i>
P2	R	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	R	<i>Klebsiella ssp</i>
P3	R	S	NT	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	NT	NT	S	<i>E. coli</i>
P4	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	NT	S	R	NT	<i>E. coli</i>
P5	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	NT	S	S	NT	<i>E. coli</i>
P6	R	S	NT	NT	S	R	R	R	S	S	R	R	S	NT	NT	R	<i>E. coli</i>
P7	R	R	NT	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	NT	NT	R	<i>E. coli</i>
P8	S	NT	R	R	S	S	R	S	S	R	S	NT	S	NT	R	NT	<i>E. coli</i>
P9	R	R	R	S	R	R	R	R	NT	R	S	R	S	NT	NT	R	<i>E. coli</i>
P10	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	NT	S	S	S	<i>E. coli</i>
P11	R	S	R	R	R	R	R	R	NT	S	S	S	NT	NT	NT	S	<i>E. coli</i>
P12	R	R	R	NT	R	NT	S	S	S	S	S	R	NT	NT	R	S	<i>E. coli</i>

R= RESISTENTE; S=SENSÍVEL; NT=NÃO TESTADO

Das 50 amostras coletadas, 12 apresentaram crescimento microbiológico, sendo que destas 91,7% (11) foram identificadas como *Escherichia coli* e 8,3% (Gráfico 1) foi identificada com *Klebsiella ssp*.

GRÁFICO 1: Perfil microbiológico das cepas isoladas



Fonte: Dados da pesquisa

Realizando a análise do perfil do antibiograma das amostras identificadas e isoladas, representado no Quadro 6, foi possível encontrar um perfil de resistência variado, sendo que o antibiótico que mais apresentou o perfil de resistência entre as cepas isoladas foi a cefalotina com 91,7%.

QUADRO 6: Perfil de resistência entre as cepas isoladas para os antibióticos analisados

ANTIBIÓTICOS	Nº Total de Isolados	Nº de Resistentes dos Isolados	% Resistentes
AMPICILINA AMP	12	10	83,3%
CIPROFLOXACINO= CIP	12	5	41,7%
COTRIMOXAZOL = COT	12	5	41,7%
AMPICILINA + AC CLAVULÂNICO= AMC	12	6	50,0%
TETRACICLINA =TET	12	9	75,0%
AMICACINA= AMI	12	5	41,7%
CEFALOTINA= CFL	12	11	91,7%
GENTAMICINA= GEN	12	6	50,0%
CEFEPIMA -> C P M	12	2	16,7%
CEFTADIZIMA = CAZ	12	4	33,3%
AZTREONAM =ATM	12	4	33,3%
CLORAFENICOL =CLO	12	7	58,3%
CEFTRIAXONA =CRO	12	3	25,0%
PEPIMÉDICO= PEP	12	0	0,0%
CEFUROXIMA =CEF	12	3	25,0%
CEFOXITINA= CFO	12	3	25,0%

Fonte: Dados da pesquisa

Pela análise dos resultados da PCR das amostras isoladas, os três genes *Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}*. (Figura 2), não foram observadas nas amostras P9, P11 e P12. Nas demais amostras estavam presentes um, dois ou os três genes conforme pode ser observado no Quadro 7.

QUADRO 7: Caracterização dos genes, *Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}* de resistência para as diferentes cepas isoladas.

Amostra	Gene <i>Bla_{SHV}</i>	Gene	Gene <i>Bla_{CTX-M}</i>
P1	-	+	-
P2	+	+	+
P3	-	+	+
P4	-	+	+
P5	-	-	+
P6	-	-	+
P7	+	+	-
P8	-	+	-
P9	-	-	-
P10	-	+	-
P11	-	-	-
P12	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa

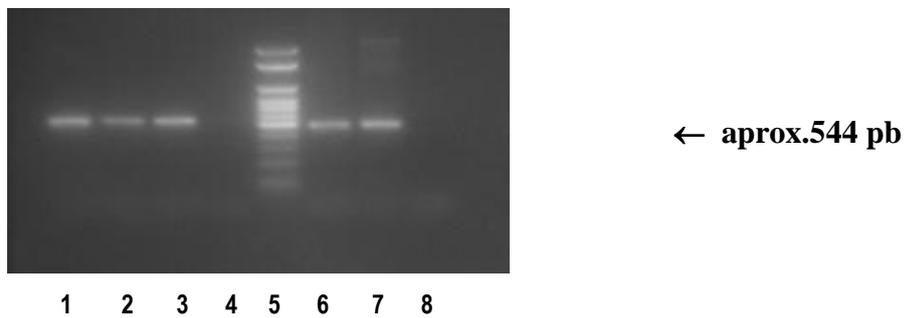


FIGURA 2: Gene *Bla_{CTX-M}*. Coluna 1: amostra P2; coluna 2: amostra P3; coluna3: amostra P4; coluna 4: amostra: P6; coluna 5: Marcador de peso molecular de 100pb; coluna 6 e 7: controle positivo e coluna 8: controle negativo.

8 DISCUSSÃO

As ESBLs são as grandes causadoras de resistência para antibióticos beta-lactâmicos em espécies da família Enterobacteriaceae. (NOGUERA, et al, 2006).

A idade é um fator epidemiológico relevante para o presente estudo, pois expõe o perfil etário do grupo avaliado e nos leva a visualizar de maneira significativa a faixa etária onde pode estar ocorrendo a gestação, que é um dos fatores significativos para o desenvolvimento de infecção do trato urinário como afirma McDermott S. et al, 2000. No presente estudo as mulheres avaliadas apresentam uma média de idade de 21 anos sendo que a maioria encontrava-se na faixa etária de 18 a 25 anos.

Quando se analisa o desenvolvimento de ITU durante a gravidez e fora do período gravídico, pode-se observar no presente estudo que a maioria das pacientes já apresentou ITU em algum momento. Fator que não está apenas condicionado à gravidez como também a alterações anatômicas, má higiene perineal. Entretanto a migração para uretra e bexiga é desencadeada, principalmente, pela atividade sexual, pelo uso de contraceptivos com espermicida, e pela alteração do pH vaginal, que pode ocorrer com alteração da flora pelo uso de antibióticos e pelo hipoestrogenismo que, habitualmente, ocorre na menopausa.(GK, 1989).

Quanto às informações dadas sobre o uso de antibióticos sem prescrição médica, 80% das 50 pacientes avaliadas afirmaram fazer o uso de antibióticos sem prescrição médica. Entende-se que o uso de antibióticos sem prescrição médica levam ao desenvolvimento de resistência à antibióticos em microorganismos. Concordando com os resultados de outros trabalhos realizados nos estados brasileiros, pode-se observar que os pacientes que tem este tipo de prática geralmente apresentam microorganismos com um perfil de resistência variado, e esta variação também se dá de cidade para cidade para uma mesma espécie bacteriana. (MOHAMMED, 2007)

Os estudos realizados sobre o perfil microbiológico e antibacteriano das cepas isoladas, puderam revelar que, das 12 amostras com crescimento microbiológico positivo, 11 foram positivas para *Escherichia coli* com o resultado do antibiograma apresentando uma significativa resistência para o antibiótico cefalotina, onde 91,9% das cepas analisadas apresentaram tal característica. Na avaliação realizada por Tankhiwale et al (2003), trás resultados semelhantes aos apresentados no presente estudo para a cepa de maior frequência isolada para este tipo de infecção que é *E. coli*.

Entretanto das doze amostras positivas para crescimento microbiológico somente foi encontrado uma cepa de *Klebsiella ssp*, esta cepa apresentou resistência a todos os antibióticos testados. Resultado semelhante foi encontrado por Lal et al (2007), nos isolados de *Klebsiella ssp* que também apresentaram múltipla resistência no teste do antibiograma, onde 86% dos isolados apresentaram esta múltipla resistência.

Todavia para a pesquisa molecular dos três tipos de genes que hidrolisam antibióticos: *Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}*, entre as amostras isoladas, ocorreu uma diversidade expressiva. Podemos observar que das 11 amostras com crescimento microbiológico para *E. coli*, 8 destas amostras apresentaram um ou mais genes investigados com exceção de 3 amostras (P9, P11 e P12) que não apresentaram nenhum dos genes pesquisados.

Baseado nestes resultados acima, em comparação com os resultados apresentados no quadro 3, onde se avalia o perfil do antibiograma destes isolados, pode-se justificar a presença da resistência expressiva nos resultados, visto que cada gene desse está relacionado com algum tipo de antibiótico ou grupo de antibióticos. Quase todos os pacientes de acordo com o Quadro 4, apresentaram resistência a cefalotina (91,7%), quando comparamos com o Quadro 5, podemos perceber a presença do gene *Bla_{TEM}* em 59% dos pacientes, sabe-se que o gene *Bla_{TEM}* pode induzir a resistência à vários antibióticos, sendo um deles a Cefalotina, o que justifica o achado.

Para as amostras (P9, P11 e P12) que não apresentaram nenhum tipo dos genes (*Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}*) testados, podemos interpretar que possivelmente eles possuam a presença de devem possuir outro tipo de gene, visto que nos resultados do antibiograma dos respectivos pacientes observou-se a resistência à um ou mais antibióticos testados.

Entretanto paciente P2, apresentou um resultado diferenciado, onde todos os genes (*Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}*) testados, foram positivados. Quando realizamos uma comparação deste achado com o resultado do antibiograma, deste mesmo paciente, no Quadro 3, podemos observar que o paciente apresenta resistência para todos os antibióticos testados. A bactéria isolada deste paciente foi *Klebsiella ssp*, a qual possui um perfil de resistência diferenciado das demais cepas isoladas. Lal et al, (2006), afirma em seus estudos que a *Klebsiella ssp* em 86 % dos isolados sempre apresentam múltipla resistência, tanto para os antibiogramas quanto para os testes moleculares, o que pode ser confirmado no presente trabalho.

9 CONCLUSÃO

- Foi observada a presença de bactérias produtoras de ESBL's, circulando entre as gestantes com ITU na cidade de Imperatriz- MA.
- Foram encontrados os três tipos de genes (*Bla_{SHV}*, *Bla_{TEM}* e *Bla_{CTX-M}*) nas amostras analisadas.
- A *E. coli* foi a bactéria mais prevalente entre as amostras isoladas de pacientes com ITU.
- *Klebsiella ssp* isolada, apresentou um perfil de multirresistência aos antibióticos testados.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção nos Serviços de Saúde. Brasília: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso : 20 nov 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. 1995. **A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlations with molecular structure.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211-1233.

CHEN, Y. M. M.; WRIGHT, P. J.; LEE, C. S.; BROWNING, G. L. Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Veterinary Microbiology*, v.94, p.57-69, 2003.

CASTONGUAY, M.H.; VAN DER SCHAAF, S.; KOESTER, W.; KROONEMAM, J.; VAN DER MERR, W.; HARMSSEN, H.; LANDINI, P. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Research in Microbiology* 157: 471-478, 2006.

DALMARCO, M.E.; BLATT, L. S.; CÓRDOVA, M. M. C. Identificação Laboratorial de Betalactamases de Espectro- Estendido (ESBLs)- Revisão. **RBAC.** vol.38(3): 171-177, 2006.

DACHI, P. Sidney; COUTINHO, A. S. S. Mário; STAMM, F.N. M. Ana; NASSAR, M. Silvia, Fatores de risco para infecção urinária em mulheres: um estudo de caso-controle. *Artigos Catarinenses de Medicina* V. 32, nº,1 de 2003 KOCH, A.; ANDRADE M.F. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. **RBAC.** v.40(1): 17-23, 2008.

DUARTE G., MARCOLIN C. A., QUINTANA S. M., CAVALLI C. R. Infecção Urinária na gravidez. **Ver. Brasileira de Ginecologia Obstetricia.** 2008; 30(2):93-100

GILSTRAP, LC. 3rd; RAMIM, S.M. Urinary tract infections during pregnancy *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001; 28(3): 581-91.

HASSAN, S. A.; JAMAL, S. A.; KAMAL, MUSTAFAR. Occurrence multidrug resistant and ESBL producing *E.coli* causing urinary tract infections. **Journal of Basic and Applied Sciences**, Vol 7, Nº1, 39-43, 2011.

HEILBERG, P. Ita, SCHOR N. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – ITU. *Rev Assoc Med Bras* 2003; 49(1): 109-116 Manual Merck, Disponível em: <<http://www.manualmerck.net/?id=153&cn=1213&ss=>>. Acesso em: 15 nov 2010.

LANE, MC.; ALTERI, CJ.; SMITH, SN.; MOBLEY, HLT. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 16669-16674, 2007

LAL, P.; KAPIL, A.; DAS, K. B.; SOOD, S. Ocoorence of TEM & SHV gene in extended spectrum Beta- lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. Isolated from a tertiary care hospital. **Indian J Mes Res** 125, February 2007, pp 173-178.

KOCH, A.; ANDRADE M.F. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. **RBAC**. v.40(1): 17-23, 2008.

KONEMAM, B. **Diagnostico Microbiológico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in **clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens***. **Infection**. 1983 Nov-Dec: 11(6);315-7.

MACLEAN, AB. Urinary tract infectionin preganancy. **Int J Antimicrob Agents**. 2001; 17(4): 273-6.

MADERMOTT, S.; CALLAGHAN, W.; SZWEJBKA, L.; MANN, H.; DAGUISE, V. **Urinary tract infections during pregnancy and mental retardation and developmental delay**. **Obstet gynecol**. 2000; 96 (1): 113-9.

MADSON B, OFEK I, CLEGG S, ABRAHAM SN. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. **Infect Immun** 1994; 62: 843-8.

Manual Merck. Disponível em: <<http://www.manualmerck.net/?id=153&cn=1213&ss=>> Acesso em 12 set. 2012.

MOHAMMED, A., MOHAMMED, S., ASAD, U. K., Etiology and Antibiotic Resistance patterns of community-acquired urinary tract infectionS in J N M C Hospital Aligarh, India. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 2007; 6: 4.

NOGUEIRA, K. S.; HIGUTI, I. H.; NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA L. B.; OLIVEIRA, S.; MATOS, A. P.; SOUZA, M.A.P.; COGO, L. L.; COSTA, L. M. D. Ocorrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Enterobacteriaceae Isolated from Hospitalized Patients in Curitiba, Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infections Diseases**, 2006;10 (6): 390-395.

NOWICKI B. Urinary tract infection in pregnant women: old dogmas and current concepts regarding pathogenesis. **Curr Infections Dis Rep.** 2002; 4(6): 529-35.

NETO, V.M. Osvaldo, Infecção do Trato Urinário. **Medicina**, Ribeirão Preto, 36: 365-369, abr/dez, 2003.

OLIVEIRA, C.F. **Prevalência das Famílias TEM, SHV e CTX-M de Beta-lactamases de espectro estendidos em *E.coli* e *Klebsiella spp.*, no Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do SUL.** 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

PICÃO, R.C.; GALES, A.C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação?. **Prática Hospitalar**. Ano IX, nº49, p. 79-84, jan-fev/2007

PATERSON D. L., BONOMO R. A. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, Oct. 2005, p. 657–686 Vol. 18, No. 4

PIRES, MCS.; FROTA, KS.; MARTINS JUNIOR, PO.; CORREIA, AF.; CORTEZ-ESCARLANTE, JJ.; SILVEIRA, CA. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40: 643-647, 2007.

SAYLERS, A.A; WHITT, D.D. *Escherichia coli* Urinary Tract Infections. In. *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, 1994. chap. 17., p.205- 212.

SOUSA, J.M.A.; FERREIRA, S.E.; CONCEIÇÃO, C. G. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NEWS LAB**. Edição 63, p. 152-174, 2004.

SOARES, G.; MOURA, U. J.; SAUCEDO, M. E.; FERREIRA, S. R.; SANTOS, V .C. R. Prevalência de Betalactamases de espectro ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas no trato urinário de pacientes ambulatoriais de Santa Maria-RS. **Disciplinarium Scientia**. Série: Ciência da Saúde, Santa Maria, v. 6, n1, 2005.

SOUSA, J.M.A.; FERREIRA, S.E.; CONCEIÇÃO, C. G. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NEWS LAB**. Edição 63, p. 152-174, 2004.

SYDON, A.C.M.D.G.; COOGAN J.A.; MORENO A.M.; MELVILLE P.A.; BENITES, N.R. Ocorrência de Fatores de Virulência em de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.4, p.401-407, out./dez., 2006

STAMM, F. N. M. Ana, LUCIANO, G. Lessandro; PERREIRA, G. Andrea, Infecção Urinária na Mulher: Características e Fatores de Risco. **Arq Cat Med** 1997 Jan/Dez; 26 (1-4):106-10.

SCHOOLINK GK. How *Escherichia coli* infects the urinary tract. **Nengl Jmed** 320 804-805, 1989.

STAMM, F.N. M. Ana, LUCIANO; G. Lessandro; PERREIRA, G. Andréa. Síndrome Disúria na Mulher. **Arq Cat Med** 1997 jan/dez; 26 (1-4): 48- 54.

SMELTZER, C. Suzanne; BRENDA G. Bare. **Brunner & Sudarth Trato de Enfermagem Médico-Cirúrgica**, 10 ed. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 2010.

STURENBURG, E.; MACK, D.; Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J Infect**, 2003 Nov; 47 (4): 273-95.

SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews**, v.60, p.167-215, 1996.

SANTOS, D.F. **Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial**. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) Universidade Católica de Goiás.

SOBEL, JD. Agentes etiológicos bacterianos na patogenia da infecção do trato urinário. In: KAYE, D.- *Clinicas Medicas da America do Norte*, Rio de Janeiro: Interlivros, 263-274,1991.

SAHLY, H.; AUCKEN, H.; BENEDI, VJ.; FORESTIEN, C.; FUSSING, V.; HANSEN, DS et al. Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by ESBL strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Pubmed-Medline University Hosp Schleswig Hotstein**, 241105 Liel Germany, 2002.

TRABULSI, L. Richard. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TORTORA, J. Gerard; FUNKE, R. Berdell; CASE, L. **Christine Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TURNER, J. PHILIP. Extended- Spectrum Beta-Lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, 2005; 41:S273-5

TANKHIWALE, S. S.; JALGAONKAR S. V.; HASSANO, U.; AHAMAD, S. Evaluation of extended spectrum beta lactamases in urinary isolates. **Indian J Med Res** **120**, December 2004, pp 553-556.

TRABULSI , L.R.; CAMPOS, L.C. Escherichia. In: TRABULSI , L.S.;SOUZA, C.P. (Eds.). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu,1999. Cap. 28. p.215-228.

VERONESI, Richardo. **Tratado de Infectologia, Editor Científico Roberto Focaccia. v. 1 e 2.** 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO

1) QUAL A SUA IDADE?

- A) Entre 18 e 25 anos B) Entre de 26 e 35 anos C) Entre 36 e 45 anos
D) Acima de 46 anos

2) QUANTAS GESTAÇÕES VOCÊ JÁ TEVE?

- A) 1 gestação B) 2 gestações C) 3 gestações D) 4 gestações ou mais

3) QUANTOS ABORTOS VOCÊ JÁ SOFREU?

- A) 1 aborto B) 2 abortos C) 3 abortos ou mais

4) VOCÊ JÁ TEVE INFECÇÃO URINÁRIA DURANTE A GRAVIDEZ?

- A) SIM B) NÃO

5) VOCÊ JÁ TEVE INFECÇÃO URINÁRIA EM OUTRO MOMENTO FORA DA GRAVIDEZ?

- A) SIM B) NÃO

6) QUANTAS INFECÇÕES URINÁRIAS VOCÊ JÁ TEVE DURANTE A GRAVIDEZ?

- A) Nenhuma B) 1 ITU C) 2 ITU D) 3 ITU E) 4 ou mais ITU

7) QUANTAS INFECÇÕES URINÁRIAS VOCÊ JÁ TEVE DURANTE A FORA DA GRAVIDEZ?

- A) Nenhuma B) 1 ITU C) 2 ITU D) 3 ITU E) 4 ou mais ITU

8) VOCÊ TEM O HÁBITO DE TOMAR ANTIBIÓTICO SEM PRESCRIÇÃO MÉDICA?

- A) SIM B) NÃO

9) HOJE VOCÊ ESTÁ INGERINDO ALGUM TIPO DE ANTIBIÓTICO?

- A) SIM B) NÃO

10) TODA VEZ QUE VOCÊ SOFRE DE INFECÇÃO URINÁRIA VOCÊ TEM O HÁBITO DE PROCURAR O MÉDICO PARA UM DIAGNÓSTICO MAIS PRECISO?

- A) SIM B) NÃO

11) QUANDO VOCÊ VAI AO MÉDICO COM SUSPEITA DE ITU, ELE SEMPRE SOLICITA CULTURA DE URINA?

A)SIM B)NÃO

12) QUANDO VOCÊ ESTÁ COM ITU E PROCURA O MÉDICO, ELE TEM O HÁBITO DE PRESCREVER O ANTIBIÓTICO SEM UMA AVALIAÇÃO LABORATORIAL?

A)SIM B)NÃO

13) VOCÊ Á TRATOU DE ITU E LOGO APÓS O TRATAMENTO DURANTE A MESMA GESTAÇÃO VOCÊ TEVE OUTRA ITU?

A)SIM B)NÃO

14) VOCÊ SABE SE POSSUI ALGUMA ALTERAÇÃO ANATÔMICA NO SEU TRATO URINÁRIO?

A)SIM B)NÃO

15) VOCÊ JÁ PASSOU POR ALGUM PROCEDIMENTO MÉDICO QUE TEVE A NECESSIDADE DO USO DE SONDA URETRAL?

A)SIM B)NÃO

16) SE SIM, VOCÊ PERCEBEU QUE LOGO APÓS O USO DA SONDA URETRAL VOCÊ DESENVOLVEU ITU?

A)SIM B)NÃO

17) VOCÊ JÁ FOI HOSPITALIZADA PARA TRATAR DE INFECÇÃO URINÁRIA, DURANTE A GRAVIDEZ?

A)SIM B)NÃO

18) VOCÊ JÁ FOI HOSPITALIZADA PARA TRATAR DE INFECÇÃO URINÁRIA FORA DO PERÍODO DA GRAVIDEZ?

A)SIM B)NÃO

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº 038/2011-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *E. coli* e *Klebsiella* spp PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO ISOLADAS DE GESTANTES COM INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO ATENDIDAS NA UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE DOS TRÊS PODERES DE IMPERATRIZ-MA.
3. **Pesquisador Responsável:** Adriana dos Santos Oliveira.
4. **Instituição / Unidade:** NMT- UFPA.
5. **Data de Entrada:** 10.06.2011.
6. **Data do Parecer:** 28.06.2011.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 27 de janeiro de 2012.


Prof. Dr. Hellen Thais Fuzii
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA.

Hellen Thais Fuzii
Coordenadora do Comitê de Ética

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Título do projeto de pesquisa: Caracterização molecular de *E. coli* e *Klebsiella spp* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido isoladas de gestantes com infecção do trato urinário no hospital público de Imperatriz-Ma

Autora: Adriana dos Santos Oliveira

Orientadora: Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Instituição: Universidade Federal do Pará

Telefone e endereço para contato: (099-96493516)- Rua Benedito Leite nº955, centro, Imperatriz- MA

Você está sendo convidada para participar desta pesquisa (título acima) que tem como objetivo identificar as bactérias que causam infecção do trato urinário e se elas são muito resistentes a alguns antibióticos utilizados no tratamento dessas infecções

Pediremos 10ml de urina em frasco apropriado (estéril). Esta urina será encaminhada ao laboratório para realização de testes para a confirmação do diagnóstico de infecção urinária, e depois saber que bactéria está causando a infecção.

Esta pesquisa oferece riscos mínimos, pois pediremos para você trazer apenas uma amostra de urina, que é um procedimento simples, mas que deve ser coletado conforme orientação correta de um profissional da saúde. Os seus dados serão anotados de maneira cuidadosa, mantendo a sua identidade em sigilo.

A pesquisa fornecerá benefícios para você e também para os profissionais de saúde, pois todos terão melhor conhecimento sobre as bactérias que podem causar infecção do trato urinário e a utilização de medicamentos corretos para o tratamento. Você terá liberdade para se retirar da pesquisa no momento que desejar, sem ter nenhum prejuízo do acompanhamento médico, no Hospital Regional Materno Infantil. Você também não terá gastos financeiros na participação desta pesquisa e também não receberá pagamento por sua participação.

Estaremos à disposição para qualquer esclarecimento.

DECLARAÇÃO

Declaro que compreendi as informações que li ou que me explicaram sobre a pesquisa em questão, ficando claros para mim, os objetivos desta pesquisa e que minha participação não terá despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, podendo retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido ou no meu atendimento neste hospital.

Imperatriz _____ de _____ de _____

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura de testemunha