

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E
NÍVEIS URINÁRIOS DE ANTIMICROBIANOS PARA O TRATAMENTO
DE INFECÇÕES NO TRATO URINÁRIO**

Gabriela Remonatto

Porto Alegre, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E
NÍVEIS URINÁRIOS DE ANTIMICROBIANOS PARA O TRATAMENTO
DE INFECÇÕES NO TRATO URINÁRIO**

Dissertação apresentada por
Gabriela Remonato para obtenção
do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Porto Alegre, 2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório da Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Afonso, meu orientador, pela confiança depositada, pelo exemplo e amizade.

À querida Prof^a Ana Lúcia Peixoto de Freitas pelo acompanhamento constante e auxílio, principalmente na fase final deste trabalho.

Aos meus pais, Ivor e Maria Inês, pelo incentivo em toda a minha formação profissional.

À Faculdade de Farmácia, pela oportunidade de realização deste curso de Pós-Graduação.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) pelo financiamento deste trabalho.

Aos Bioquímicos da Unidade de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do HCPA, pela disponibilidade no fornecimento dos isolados bacterianos.

Aos colegas da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, pelo auxílio, apoio técnico e amizade, em especial à Ana Lúcia Antunes e Leandro Perez e também ao Prof. Cícero Dias.

Ao Edson, pela compreensão, amor, e incentivo durante todo o trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Infecção no trato urinário (ITU).....	4
3.2 Etiologia das ITUs.....	5
3.3 Terapia antimicrobiana.....	6
3.3.1 Ampicilina.....	8
3.3.2 Cefalotina.....	8
3.3.3 Ciprofloxacino.....	9
3.3.4 Cotrimoxazol	10
3.3.5 Gentamicina	11
3.4 Resistência de <i>E. coli</i> uropatogênicas aos antimicrobianos.....	12
3.5 Farmacocinética e farmacodinâmica da terapia antimicrobiana.....	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Materiais.....	17
4.2 Métodos.....	18
4.2.1 <u>Identificação e seleção das amostras</u>	18
4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	19
4.2.3 Testes com disco de alta potência.....	21
4.2.4 Análise estatística dos dados.....	22
5 RESULTADOS	23
5.1 Controle do teor dos discos de alta potência.....	23
5.2 Testes com os antimicrobianos.....	23
5.2.1 Ampicilina.....	23

	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	23
	Testes com discos de alta potência.....	24
	Determinação do ponto de corte do halo de inibição.....	27
5.2.2	Cefalotina.....	29
	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	29
	Testes com discos de alta potência.....	29
	Determinação do ponto de corte do halo de inibição.....	31
5.2.3	Ciprofloxacino.....	33
	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	33
	Testes com discos de alta potência.....	34
	Determinação do ponto de corte do halo de inibição.....	37
5.2.4	Cotrimoxazol.....	37
	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	37
5.2.5	Gentamicina.....	38
	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	38
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÕES	48
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição da MIC para ampicilina em <i>E. coli</i> resistentes a ampicilina.....	24
Figura 2	Distribuição de MIC x Halo para disco de 500µg de ampicilina.....	25
Figura 3	Distribuição de MIC x Halo para disco de 400µg de ampicilina.....	26
Figura 4	Distribuição de MIC x Halo para disco de 300µg de ampicilina.....	27
Figura 5	Curva ROC para MIC x Halos com disco contendo 500 µg de ampicilina.....	28
Figura 6	Distribuição da MIC para cefalotina em <i>E. coli</i> urinárias.....	29
Figura 7	Distribuição de MIC x Halo para disco de 200µg de cefalotina.....	30
Figura 8	Distribuição de MIC x Halo para disco de 100µg de cefalotina.....	31
Figura 9	Curvas ROC para MIC x Halos com disco de 100 µg e 200 µg de cefalotina.....	32
Figura 10	Distribuição da MIC para ciprofloxacino em <i>E. coli</i> urinárias.....	33
Figura 11	Distribuição de MIC x Halo para disco de 200µg de ciprofloxacino.....	34
Figura 12	Distribuição de MIC x Halo para disco de 150µg de ciprofloxacino	35
Figura 13	Curva ROC para MIC x Halos com disco de 200 µg de ciprofloxacino....	36

Figura 14 Distribuição da MIC para sulfametoxazol-trimetoprima (SMX-TMP) em *E. coli* resistentes ao cotrimoxazol.....37

Figura 15 Distribuição da MIC para gentamicina em *E. coli* urinárias resistentes a gentamicina.....38

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	<u>Clinical and Laboratory Standards</u> Institute
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
ITU	Infecção no Trato Urinário
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
NCCLS	<u>National Committee of Clinical and Laboratory Standards</u>
SMX-TMP	Sulfametoxazol – Trimetoprima ou cotrimoxazol
UMBM	Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular
UPB	Unidade de Pesquisa Biomédica

RESUMO

Introdução: As Infecções no trato urinário (ITU) estão entre as doenças infecciosas mais comumente diagnosticadas e são responsáveis por uma grande proporção do consumo de agentes antimicrobianos, sendo a *Escherichia coli* o microorganismo mais freqüentemente envolvido. Os antimicrobianos utilizados no tratamento das ITU sofrem concentração no processo de eliminação, ocasionando altos níveis de antimicrobiano na urina. No entanto, os testes que avaliam a susceptibilidade aos antimicrobianos são baseados em concentrações séricas. Assim, é de interesse a padronização de um teste que utilize níveis urinários (discos de alta potência) dos antimicrobianos frente aos uropatógenos. **Objetivo:** padronizar teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para *E. coli* de ITU, com concentrações de antimicrobianos atingidas na urina. **Métodos:** foram utilizados 204 isolados bacterianos resistentes a pelo menos um dos seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprima(cotrimoxazol) para os quais foi determinada a MIC através de diluição em agar. Através da análise das MIC obtidas e das concentrações que os antimicrobianos atingem na urina, foram estabelecidas as concentrações dos discos de alta concentração. As seguintes concentrações de disco foram utilizadas: ampicilina (500, 400, 300 µg), cefalotina (200, 100 µg) e ciprofloxacino (200, 150 µg). **Resultados:** a ampicilina apresentou MIC $\geq 512\mu\text{g/mL}$ para cerca de 50% dos isolados. Dos discos testados, o de 500 µg mostrou melhor coeficiente de correlação de Spearman (r_s : -0,659) e foi escolhido para a determinação do ponto de corte através de curva ROC (*receiver operating characteristic*). Pela curva, um diâmetro de halo de 9 mm separaria as amostras resistentes (R) das susceptíveis (S) a altos níveis de ampicilina com 100% de sensibilidade e especificidade de 50%. A cefalotina apresentou MIC inferior a $256\mu\text{g/mL}$ para 78% dos isolados sendo que o " r_s " para os discos de 100 e 200 µg foi o mesmo: -0,744. Pela curva ROC, halos de 17mm (disco de 200µg) e 13mm (disco de 100µg) discriminariam amostras R de S com 100% de sensibilidade e 96,9% de especificidade. O ciprofloxacino apresentou MIC $\leq 128\mu\text{g/mL}$ para mais de 50% dos isolados, sendo que o " r_s " foi melhor com o disco de 200µg (r_s :-0,916). Um halo de 21mm separaria as amostras S e R com 100% de sensibilidade e 78,9% de especificidade. Para o cotrimoxazol, 95% das amostras se mostraram resistentes a altos níveis e os testes com disco de alta potência não foram realizados. Para a gentamicina o baixo nº de amostras (n=22) prejudicou a análise, mas cerca de 63% dos isolados seriam susceptíveis a altos níveis. **Conclusão:** O presente estudo demonstrou que o uso de discos de alta concentração pode ser útil para avaliar a susceptibilidade de isolados urinários. Isto tem importância em laboratórios clínicos onde, embora haja dificuldade na realização da MIC, testes de disco-difusão estão incorporados na rotina.

Palavras - chave: infecção urinária, *E. coli*, MIC, concentração urinária de antimicrobianos

ABSTRACT

Correlation Between Minimum Inhibitory Concentration and Urinary Levels of Antimicrobials for Treatment of Infections in Urinary Tract

Introduction: The urinary tract infections (UTI) are among the most common infectious diseases and are responsible for a high antimicrobial usage. The *Escherichia coli* is the main microorganism involved in UTI. The antimicrobials used for treatment of UTI concentrate in the urinary tract and this leads to high levels of them in the urine. However, the susceptibility tests are based on the serum levels of the antimicrobials. Therefore, it is of interest to develop a test which correlates the urinary levels of antibiotics (discs with high levels) with the uropathogens. **Objective:** to propose a susceptibility test of *E. coli* from UTI using doses of the antimicrobials reached in the urine. **Methods:** a total of 204 clinical isolates of *E. coli* resistant, according to conventional antimicrobial susceptibility test to, at least, one of the following antimicrobials: ampicillin, cefalotin, ciprofloxacin, gentamicin and trimetoprima- sulfametoxazol. The MIC was determined by the agar dilution technique. According to the results of the MICs and the urinary levels of the antimicrobials it was possible to establish the concentration of the high potency discs. The following concentration of discs were used: ampicilina (500, 400, 300 µg), cefalotin (200, 100 µg) and ciprofloxacin (200, 150 µg). **Results:** ampicillin presented MIC $\geq 512\mu\text{g/mL}$ for around 50% of *E. coli* isolates. The disc containing 500 µg of ampicillin displayed the best coefficient of correlation (r_s : -0,659) and it was chosen to establish diameter breakpoint according to the ROC curve. A diameter of 9 mm would discriminate high level ampicillin resistant isolates with 100% and 50% of sensitivity and specificity, respectively. Cefalotin presented MIC below 256 µg/mL for 78% of *E. coli* isolates. Its " r_s " for discs containing 100 and 200µg was the same: -0,744. According to the ROC curve zone diameters of 17mm (disk of 200µg) e 13mm (disk of 100µg) were able to discriminate isolates resistant with 100% and 96.9% of sensitivity and specificity, respectively. Ciprofloxacin presented MIC $\leq 128\mu\text{g/mL}$ for more than 50% of isolates and the best " r_s " was achieved with the 200µg (r :-0,916) disk. A zone diameter of 21mm would discriminate susceptible isolates with 100% and 78.9% of sensitivity and specificity, respectively. A total of 95% of *E. coli* isolates proved to be resistant to high levels of cotrimoxazole and, therefore, tests with high potency disks were not performed. Due to the small numbers of isolates resistant to gentamycin (n=22) we were not able to perform further analysis although 63% of *E. coli* isolates proved to be susceptible to high levels of this antimicrobial. **Conclusion:** This study indicated that the susceptibility test with disks containing high levels of antimicrobials may be useful to evaluate the susceptibility of urinary tract isolates. This may be of importance as the clinical laboratory may not be able to perform the MIC test for routine isolates.

Keywords: urinary tract infection, *E. coli*, MIC, urinary concentration of antimicrobials

1.INTRODUÇÃO

As Infecções no trato urinário (ITU) caracterizam-se pela presença de microorganismos na urina e invasão das estruturas do trato urinário. Podem ser divididas em complicadas e não complicadas, de origem hospitalar ou comunitária, sintomáticas ou assintomáticas (KUNIN, 1997). Estão entre as doenças infecciosas mais comumente diagnosticadas e podem resultar em uma significativa mortalidade. Estas infecções são responsáveis por uma grande proporção do consumo de agentes antimicrobianos, e possuem amplo impacto sócio econômico. O conhecimento dos organismos causadores, seus dados epidemiológicos e sua susceptibilidade aos antimicrobianos são essenciais para otimizar o tratamento e evitar a emergência de resistência bacteriana, que é responsável pelo aumento de falhas terapêuticas.(DIAS NETO, 2003).

O microorganismo mais comumente envolvido nas infecções urinárias, tanto comunitárias como hospitalares é a *Escherichia coli*, que é um bacilo Gram-negativo fermentador de glicose, da família das Enterobactérias. Esta bactéria possui diversos fatores de virulência, que possibilitam a colonização e posterior infecção do trato urinário (BASKIN *et al*, 2002; KUNIN, 1997; LOPES & TAVARES, 2004a; SCHOOLNIK,1989).

As opções de tratamento disponíveis incluem os β - lactâmicos, sulfametoxazol-trimetoprima (SMX-TMP, cotrimoxazol), fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (GUPTA *et al*, 2001a, LOPES & TAVARES, 2004a). Entretanto, com o aumento da resistência e pelo fato de *E. coli* uropatogênicas não apresentarem perfil de susceptibilidade constante aos antimicrobianos utilizados para o tratamento das infecções no trato urinário, é necessária a realização de testes de susceptibilidade (antibiograma). O teste de susceptibilidade utilizado na

rotina é o de disco difusão ou Kirby-Bauer, cujos pontos de corte se baseiam em concentrações séricas dos antimicrobianos (CLSI, 2005).

Através de dados farmacocinéticos, sabe-se que alguns antimicrobianos são concentrados na urina durante o processo de eliminação, e que portanto atingem concentrações maiores do que as utilizadas como padrão no antibiograma. Assim, é esperado que muitos microorganismos considerados resistentes possam responder ao tratamento nas infecções urinárias. Isso porque a concentração atingida neste sítio supera freqüentemente a concentração inibitória mínima (MIC) do microorganismo causador da infecção (FRIMODT-MOLLER, 2002b; NICOLLE, 2003). Desta forma, alguns antimicrobianos poderiam ainda ser utilizados, mesmo que no antibiograma o microorganismo tenha sido determinado como resistente.

Como o antibiograma realizado na rotina pode não estar refletindo a real susceptibilidade do microorganismo ao antimicrobiano, o mais adequado para a avaliação da susceptibilidade seria o uso de um método que determinasse a concentração inibitória mínima do microorganismo para o antimicrobiano, como a microdiluição em caldo ou a diluição em ágar. Entretanto, por estes métodos serem bastante trabalhosos e terem um custo elevado, existe uma dificuldade de realização deste tipo de teste no laboratório clínico. Por isso, seria de grande interesse a padronização de um teste que fosse de fácil incorporação à rotina do laboratório e que pudesse correlacionar a MIC dos uropatógenos com as concentrações do antimicrobiano na urina.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral: Padronização de um teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (antibiograma) para *E. coli* de ITUs com altas concentrações de antimicrobianos atingidas na urina.

2.2 Objetivos específicos:

1. Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de cepas de *E. coli* que tenham exibido perfil de resistência no método de Kirby- Bauer com os pontos de corte padronizados pelo CLSI aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino, cotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprima) e gentamicina.
2. Testar, contra as mesmas cepas, discos de alta potência para os antibióticos em questão, que reflitam concentrações atingidas na urina.
3. Correlacionar as MIC obtidas com os halos formados pelos discos de alta potência.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Infecção no Trato Urinário

Infecção no Trato Urinário (ITU) é um termo amplo, utilizado para descrever a presença microbiana na urina com invasão das estruturas do trato urinário. Os microorganismos podem penetrar no trato urinário pelas porções distais da uretra, por instrumentos inseridos na uretra e bexiga (infecção ascendente) ou pela corrente sanguínea (infecção descendente) (KUNIN, 1997).

A infecção urinária pode comprometer somente o trato urinário baixo, o que especifica o diagnóstico de cistite, ou afetar simultaneamente o trato urinário inferior e o superior; neste caso, utiliza-se a terminologia infecção urinária alta, também denominada pielonefrite. Tanto a infecção urinária baixa como a alta podem ser agudas ou crônicas e sua origem pode ser comunitária ou hospitalar (LOPES & TAVARES, 2004a).

Estas infecções estão entre as condições mais comuns encontradas na prática clínica e nos hospitais. Ocorrem em ambos os sexos e em todas as idades, produzindo considerável morbidade principalmente entre os indivíduos propensos a infecções recorrentes (KUNIN, 1997). São muito menos comuns em homens que em mulheres, e nestes, estão freqüentemente associadas com prostatite bacteriana crônica, e tendem a ocorrer mais freqüentemente na infância, ou na fase idosa (SOMMERS, 1983). Em mulheres, os casos tendem a aumentar com a idade (KUNIN, 1997).

Nas crianças, particularmente no primeiro ano de vida, a infecção urinária também é muito comum, sendo prevalente no sexo feminino. Nesta população de

pacientes, predomina a pielonefrite, recorrente na maioria dos casos, devido à presença de refluxo vésico-ureteral, uni ou bilateral (LOPES & TAVARES, 2004a).

As ITUs podem ser classificadas em complicadas e não complicadas, e a distinção clínica entre elas é de extrema importância por determinar a severidade da infecção, estratégias terapêuticas e resultados clínicos (KUNIN, 1997).

Infecções não complicadas são aquelas nas quais não se detecta anormalidade estrutural ou lesões neurológicas (KUNIN, 1997; NICOLLE, 2003). Ocorrem mais comumente em mulheres saudáveis e geralmente respondem ao tratamento com antimicrobianos (KUNIN, 1997). Aproximadamente 25% de todas as mulheres podem ter no mínimo uma experiência com ITU durante sua vida (BASKIN *et al*, 2002; BROWN *et al*, 2002; SEFTON, 2000), resultando em uma significativa morbidade e custos dos sistemas de saúde (GUPTA *et al*, 2001a).

Infecções complicadas ocorrem em indivíduos de ambos os sexos, quando existem alterações estruturais ou funcionais no trato urinário, ou fatores de base como idade, diabetes ou cateterização (KUNIN, 1997; NABER, 2001; NICOLLE, 2003; RONALD, 2002). Este tipo de infecção é de difícil tratamento com antimicrobianos, e geralmente requer uma correção no defeito de base (KUNIN, 1997).

3.2 Etiologia das ITUs

A patogênese das infecções no trato urinário envolve uma série de interações entre hospedeiro e microorganismo. Os microorganismos invasores são quase sempre parte da microbiota endógena do hospedeiro e geralmente se desenvolvem bem na urina. Os mais comuns são bactérias Gram-negativas que pertencem à família das Enterobactérias, sendo a *Escherichia coli* o membro mais importante nesse quadro, tanto nas infecções complicadas como nas não-complicadas (KUNIN, 1997; LOPES & TAVARES, 2004a).

A virulência bacteriana da *E. coli* é multifatorial e inclui a capacidade de aderência que pode ser o primeiro passo para a colonização e subsequente infecção

(SCHOOLNIK,1989; BASKIN *et al*, 2002). Esta bactéria possui cerca de 170 diferentes tipos de antígenos de parede celular (Ag O), cerca de 80 antígenos capsulares (Ag K), 50 antígenos flagelares (Ag H) e diversos tipos de fimbrias (pili) e adesinas (KUNIN, 1997). As *E. coli* uropatogênicas são hemolíticas, resistentes à ação bactericida do soro humano e podem possuir pili tipo 1 (que se liga a glicoproteínas nas superfícies uroepiteliais) quando causam cistite, e pili Gal-Gal (P fimbriae), quando causam pielonefrite (SCHOOLNIK,1989; KAU *et al*, 2005).

Em mulheres, há uma conexão direta entre os organismos que colonizam a área periuretral e vaginal e a subsequente infecção (RONALD, 2002; SOMMERS, 1983; KAU *et al*, 2005). Há, também, evidências de um habitat intestinal das bactérias uropatogênicas, uma vez que estas cepas de *E. coli* são encontradas na microbiota colônica (RONALD, 2002).

A alta incidência de ITUs na população em geral, o potencial para complicações, especialmente em subgrupos de alto risco e os custos associados com o tratamento, enfatizam a importância de uma antibioticoterapia apropriada (GASPARI & BOSKER, 2003).

3.3 Terapia antimicrobiana

Diversos fatores devem ser considerados na seleção da terapia antimicrobiana apropriada. Estes incluem a duração da terapia, espectro de atividade do agente antimicrobiano, prevalência da resistência na comunidade, potencial para efeitos adversos e farmacocinética dos antimicrobianos empregados (NICOLLE, 2003). O ideal na escolha do fármaco e duração da terapia adequada é produzir uma terapia focada, que alcançará efetividade clínica, enquanto previne ou minimiza o aumento da resistência (DAVID *et al*, 2005).

Os agentes antimicrobianos usados mais frequentemente para tratar infecções no trato urinário incluem os β - lactâmicos, sulfametoxazol-trimetoprima (SMX-TMP, cotrimoxazol), fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (BARROS, 2002; GUPTA *et al*, 2001; SEFTON, 2000; LOPES & TAVARES, 2004a), sendo o SMX-

TMP o antimicrobiano de primeira escolha nas infecções não complicadas (WARREN *et al*, 1999; NICOLLE, 2003; LOPES & TAVARES, 2004a).

Devido ao aumento da resistência ao cotrimoxazol e β - lactâmicos, as fluoroquinolonas - principalmente ciprofloxacino - tornaram-se os agentes de escolha em grande número de pacientes com infecções não complicadas (BROWN *et al*, 2002; GASPARI & BOSKER, 2003) e são alternativas de tratamento empírico (KILLGORE *et al*, 2004). Em um regime de 3 dias, ciprofloxacino se mostrou equivalente ao SMX- TMP (NABER, 2001). Entretanto, tem sido demonstrado um aumento no número de relatos de *Escherichia coli* resistente a quinolonas, e este fato está relacionado ao seu consumo elevado (KAPOOR & AGGARWAL, 1997; CHOMARAT, 2000), sendo que a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) não recomenda seu uso como primeira linha de tratamento empírico (WARREN, 1999; MEHNERT-KAY; 2005).

Em 2001, estudo mostrou que os fatores de risco para aquisição de ITU com *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacino foram o uso de ciprofloxacino, uso prévio de fluoroquinolonas, uso prévio de qualquer antimicrobiano, ITU recorrente. Dentre os 40 isolados testados, 38 permaneceram susceptíveis a nitrofurantoína e 31 a cefazolina e somente 3 foram susceptíveis ao SMX-TMP. Os resultados sugeriram que nitrofurantoína ou uma cefalosporina de 1ª geração seriam uma alternativa efetiva para *E. coli* resistente a ciprofloxacino (KILLGORE *et al*, 2004).

Pelo fato de *E. coli* uropatogênicas não apresentarem perfil de susceptibilidade constante aos antimicrobianos utilizados para o tratamento das infecções no trato urinário, se faz necessária a realização do teste de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos (antibiograma). As concentrações de antimicrobianos, concentrações inibitórias mínimas (MIC) e diâmetros de halo de inibição que expressam resistência ou susceptibilidade, são padronizados internacionalmente por órgãos como o National Committee of Clinical and Laboratory Standards (NCCLS), atualmente Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Também cabe salientar, que embora no Brasil seja utilizado mais freqüentemente o CLSI, existem outras padronizações, dentre elas a Britânica (BSAC), que utiliza

pontos de corte diferentes para o teste de disco difusão, onde são utilizadas concentrações nos discos e diâmetros de halo diferentes do CLSI.

3.3.1 Ampicilina

Antimicrobiano β -lactâmico, do grupo das aminopenicilinas, que apresenta estabilidade em meio ácido e possui absorção via oral, muito embora esta sofra interferência de alimentos. É ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Atua impedindo a síntese da parede celular e por isso sua ação é bactericida (GOODMAN, 2003; TAVARES, 1996).

A administração de 250 mg via oral produz níveis séricos de 1,8 - 2,9 $\mu\text{g/mL}$ em 2 horas. Uma dose via oral de 500 mg resulta em picos séricos médios de 3 - 6 $\mu\text{g/mL}$ (AHFS, 2000). A ampicilina é eliminada na forma ativa pela via urinária, principalmente por secreção tubular, atingindo níveis na urina que variam de 250 a 1000 (MARTINDALE, 1999; KUNIN, 1987). Após administração parenteral, cerca de 80% é excretada da urina em 6 horas (MARTINDALE, 1999).

Utilizada num regime de posologia de 500mg (8/8h ou 6/6h) por 3 -7 dias para ITUs não complicadas e 7 - 14 dias para pielonefrite (MARTINDALE, 1999; AHFS, 2000, NICOLLE, 2003).

Para a realização do antibiograma, os pontos de corte de diâmetro de halo, com um disco contendo 10 μg estabelecidos pelo CLSI são: Resistente (R): $\leq 13\text{mm}$, Intermediário (I): 14- 16mm e Susceptível (S): $\geq 17\text{mm}$. As MIC equivalentes aos pontos de corte são: $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ para resistente e $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ para susceptível (CLSI, 2005).

3.3.2 Cefalotina

Antimicrobiano β -lactâmico pertencente ao grupo das cefalosporinas de primeira geração, que possui atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas. Não é absorvida pela via oral, e devido à dor causada pela injeção intramuscular, é utilizada preferencialmente pela via intravenosa. Apresentada na forma sódica, atua inibindo a síntese de peptidoglicanos da parede celular bacteriana, ligando-se as PBPs (proteínas ligadoras de penicilina) e impedindo a ligação das cadeias de ácido murâmico (TAVARES, 1996).

Após injeção I.V. de 1000 mg em adultos, o antibiótico atinge o nível sérico de 30 µg/mL em 15 minutos (TAVARES, 1996; MARTINDALE, 1999) caindo para 24 µg/mL em 30 minutos e 6 a 10 µg/mL em 1 hora. A infusão gota a gota I.V. de 12 g/dia mantém níveis séricos de 10 a 30 µg/mL (TAVARES, 1996).

A cefalotina é eliminada em maior parte pelos rins, principalmente por secreção tubular.. Os níveis atingidos na urina chegam a 800 e 2500 µg/mL após doses intramusculares de 500 e 1000 mg, respectivamente (KUNIN, 1987; MARTINDALE, 1999).

Para a realização do antibiograma, os pontos de corte de diâmetro de halo, com um disco contendo 30 µg estabelecidos pelo CLSI são: Resistente (R): ≤ 14mm, Intermediário (I): 15- 17mm e Susceptível(S): ≥ 18mm. As MIC equivalentes aos pontos de corte são: ≥ 32 µg/mL para resistente e ≤ 8 µg/mL para susceptível (CLSI, 2005).

3.3.3 Ciprofloxacino

As fluoroquinolonas são largamente usadas para o tratamento de ITUs complicadas e não complicadas devido ao seu amplo espectro antibacteriano. O ciprofloxacino é um representante deste grupo de compostos altamente ativos contra *E. coli* e outras espécies de *Enterobacteriaceae* (NABER, 2001). Atua inibindo a ação das subunidades A da DNA girase e a topoisomerase IV, impedindo a síntese de ácidos nucléicos e possuindo ação bactericida (TAVARES, 1996; GOODMAN, 2003; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

É utilizado na dose de 500 mg de 12/12 horas por 3 dias via oral (LOPES & TAVARES, 2004b) ou 250mg, 12/12 horas por 3 dias (NICOLLE, 2003; MEHNERT-KAY, 2005), sendo uma boa opção de tratamento em locais onde as taxas de resistência ao SMX-TMP são altas (WARREN, 1999; NABER, 2000). Absorvido pela via oral, atinge concentração máxima sanguínea 2 horas após a administração. Atinge concentração sérica de aproximadamente 2 µg/mL uma hora após a ingestão de 500mg (TAVARES, 1996; MARTINDALE, 1999; GOODMAN, 2003).

A eliminação ocorre principalmente pela via renal, por secreção tubular, na forma ativa e metabólitos. O tempo de meia vida é de 4 horas (TAVARES, 1996). Cerca de 40-50% de uma dose oral é excretada na urina na forma ativa (MARTINDALE, 1999). Os níveis atingidos na urina após doses de 250 mg e 500 mg são superiores a 200 µg/mL e 350 µg/mL, respectivamente (AHFS, 2000; GUPTA *et al*, 2001a). Num período de 6 horas após a administração de 500mg foram detectados na urina 237 µg/mL (WELL, 1998).

Para a realização do antibiograma, os pontos de corte de diâmetro de halo, com um disco contendo 5µg estabelecidos pelo CLSI são: Resistente (R): ≤ 15mm, Intermediário (I): 16- 20mm e Susceptível (S): ≥ 21mm. As MIC equivalentes aos pontos de corte são: ≥ 4 µg/mL para resistente e ≤ 1 µg/mL para susceptível (CLSI).

3.3.4 Cotrimoxazol (SMX-TMP)

Antimicrobiano resultante da associação sinérgica do sulfametoxazol (sulfonamida) e trimetoprima (derivado de pirimidina), contendo uma parte de trimetoprima e cinco partes de sulfametoxazol (TAVARES, 1996; GOODMAN, 2003).

As sulfonamidas são fármacos essencialmente bacteriostáticos, que competem com o PABA (ácido para-amino-benzóico) impedindo a formação do ácido fólico. O trimetoprima tem uma ação seqüencial na cadeia metabólica, inibindo as diidrofolato-redutases e impedindo a formação dos tetraidrofolatos. Os dois fármacos possuem perfil farmacocinético semelhante, apresentando rápida absorção oral e eliminação renal por filtração glomerular (TAVARES, 1996; GOODMAN,

2003). Cerca de 60% do trimetoprima e 25-50% do SMX-TMP são eliminados na urina em 24 horas (GOODMAN, 2003).

Após administração de 160 mg/ 800mg (TMP/SMX), o nível sanguíneo máximo de 1,4µg/mL (TMP) e 40 µg/mL (SMX) é atingido em 2 a 4 horas (TAVARES, 1996), e as concentrações atingidas na urina são de cerca de 75 µg/mL (TMP) e 190 µg/mL (SMX) (GUPTA *et al*, 2001a).

Geralmente, este fármaco é utilizado em um regime de posologia de 3 dias para o tratamento de cistite (160 mg/ 800mg TMP/SMX 12/12h) (WARREN *et al*, 1999; NABER, 2000; NICOLLE, 2003; LOPES & TAVARES, 2004b). É um medicamento barato e geralmente bem tolerado (McCARTY *et al*, 1999).

Para a realização do antibiograma, os pontos de corte de diâmetro de halo, com um disco contendo 1,25/ 23,75 µg (TMP/SMX) estabelecidos pelo CLSI são: Resistente (R): ≤ 10mm, Intermediário (I): 11- 15mm e Susceptível (S): ≥ 16mm. As MIC equivalentes aos pontos de corte são: ≥ 8/ 152 µg/mL (TMP/SMX) para resistente e ≤ 2/ 38 µg/mL (TMP/SMX) para susceptível (CLSI, 2005).

3.3.5 Gentamicina

A gentamicina é um complexo formado por três antibióticos: C1, C1-a e C2, apresentada na forma de sulfato. Pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, que constituem uma classe de antibióticos ativos principalmente contra os bacilos Gram-negativos, com ação bactericida por interferir na síntese de proteínas, ligando-se ao ribossomo. Não apresenta absorção via oral e é estável em pH de 6 a 8 (TAVARES, 1996).

A principal via de administração é a intramuscular e o nível sérico máximo ocorre em 30 a 90 minutos. Após injeção I.M. de 1,5 mg/Kg, são obtidos níveis séricos de cerca de 6 a 8 µg/mL em 1 hora. Possui marcada afinidade pelo tecido cortical renal, acumulando-se em concentrações de 10 a 50 vezes as sanguíneas (TAVARES, 1996).

A eliminação da gentamicina ocorre pela via renal, por filtração glomerular. Após uma única dose, aproximadamente 50 a 65% são excretados na urina em 24 horas (TAVARES, 1996). As concentrações alcançadas na urina excedem os 100 µg/mL (GOODMAN, 2003; MARTINDALE, 1999), podendo alcançar até 413 µg/mL após dose única de 1 mg/Kg (KUNIN, 1987; AHFS, 2000).

Para a realização do antibiograma, os pontos de corte de diâmetro de halo, com um disco contendo 10 µg estabelecidos pelo CLSI são: Resistente (R): ≤ 12mm, Intermediário (I): 13- 14mm e Susceptível (S): ≥ 15mm. As MIC equivalentes aos pontos de corte são: ≥ 8 µg/mL para resistente e ≤ 4 µg/mL para susceptível (CLSI, 2005).

3.4 Resistência de *E. coli* uropatogênicas aos antimicrobianos

Nos Estados Unidos, Karlowsky e cols encontraram taxas de resistência em *E. coli* isoladas de urina de 38%, 17,5% e 2,3% para ampicilina, cotrimoxazol e ciprofloxacino, respectivamente, nos anos de 1998 a 2001. O estudo também mostrou que 9,5% e 4,7% das cepas de *E. coli* resistentes ao cotrimoxazol e ampicilina também se mostraram resistentes ao ciprofloxacino (KARLOWSKY *et al*, 2003). Em estudo anterior, foi demonstrado que, entre ampicilina, nitrofurantoína, SMX-TMP e ciprofloxacino, somente o último possui taxas de resistência que vêm aumentando anualmente (KARLOWSKY *et al*, 2002). Sahm e cols demonstraram que a resistência à ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino e SMX-TMP foi encontrada em 39,1%, 15,6%, 3,7% e 18,6% dos isolados, respectivamente, e que o fenótipo de multirresistência mais comum foi ampicilina- SMX-TMP-cefalotina (SAHM *et al*, 2001).

Ainda nos Estados Unidos, estudo realizado entre os anos 1992 e 1996 por Gupta e cols, mostrou que houve um significativo aumento na prevalência de resistência de *E. coli* a SMX-TMP (de 9 para 18%), cefalotina (de 20 para 28%) e ampicilina (de 26 para 34%). A resistência ao ciprofloxacino permaneceu menor que 1% (GUPTA *et al*, 1999). Em 1999, a análise de isolados de pacientes da comunidade identificou uma resistência a ampicilina e cefalosporinas de primeira

geração em torno de 40%, enquanto a resistência ao ciprofloxacino permaneceu baixa (cerca de 3%) (RONALD, 2002).

Outro estudo nos EUA mostrou que entre mulheres com infecções adquiridas na comunidade, a resistência ao SMX-TMP e a ampicilina foi cerca de 17% e 36% respectivamente (GUPTA, 2001). Brown e cols pesquisaram a susceptibilidade de isolados de *E. coli* obtidas de mulheres com ITU não complicada (cistite aguda) de 1992 a 1999. Foi demonstrado que a prevalência de resistência a ampicilina e cefalotina foi alta (cerca de 30% e 55%, respectivamente) enquanto que a prevalência de resistência ao ciprofloxacino e gentamicina foi baixa (cerca de 1,3% para ambos) no período do estudo. Em relação ao cotrimoxazol (SMX-TMP), houve um aumento na resistência durante o estudo (de 8,1% a 15,8%). A taxa de sucesso terapêutico do tratamento com SMX-TMP em pacientes com um isolado resistente a este fármaco foi de 55%, indicando que uma terapia mais prolongada poderia erradicar a infecção (BROWN, 2002).

Nos EUA e Canadá, um estudo de vigilância de infecções no trato urinário verificou que de 2003 a 2004, 37,7%, 5,5%, e 21,3% das *E.coli* eram resistentes a ampicilina, ciprofloxacino e SMX/TMP, respectivamente (ZHANEL *et al*, 2006).

Em hospitais Latino-Americanos, Gales e cols verificaram uma resistência em *E. coli* uropatogênicas de cerca de 57% para ampicilina, 18% para ciprofloxacino, 10% para gentamicina e de 47% para o cotrimoxazol entre os anos de 1997 e 2000 (GALES *et al*, 2002). Nos hospitais Norte Americanos e Europeus as taxas de resistência à ampicilina, ciprofloxacino e SMX-TMP foram de 37 e 51%, 4 e 15%, e 23 e 33%, respectivamente (GORDON *et al*, 2003). No estudo realizado por Farrell e cols, entre os anos de 1999 e 2000 no Reino Unido, que englobou infecções adquiridas na comunidade e hospitalares, a prevalência da resistência em *E. coli* foi de cerca de 2,3% para ciprofloxacino e 1,2% para gentamicina (FARREL *et al*, 2003).

Kahlmeter, no estudo ECO.SENS entre 1999 e 2000, encontrou taxas médias de resistência em *E. coli* de ITU não complicadas em 16 países europeus e Canadá de 29,8% para ampicilina, 14,1% para cotrimoxazol, 2,3% para ciprofloxacino e 1,0%

para gentamicina. As maiores taxas de resistência ocorreram na Espanha e em Portugal, onde a resistência ao ciprofloxacino chegou a 14,7 e 5,8%, gentamicina 4,7 e 3,5 % e cotrimoxazol 25,7 e 26,7 %, respectivamente (KAHLMETER, 2003). Nos mesmos países, demonstrou-se que o fenótipo de resistência associada mais comum foi ampicilina/cotrimoxazol (KAHLMETER & MENDAY, 2003). Na Noruega, outro estudo mostrou que a taxa de resistência da *E. coli* à ampicilina foi de 23%, cotrimoxazol 15% e cefalotina 5% (GRUDE *et al*, 2001). Na Espanha, Alós e cols demonstraram que 57,3%, 2,4%, 25% e 14% dos isolados de *E. coli* de ITU adquiridas na comunidade eram resistentes a ampicilina, gentamicina, SMX-TMP e ciprofloxacino, respectivamente (ALÓS *et al*, 2005).

No Brasil, em Ribeirão Preto, Dias Neto e cols verificaram que 59%, 42%, 22%, 6% e 50% das *E. coli* isoladas de ITU comunitárias eram resistentes a ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino, gentamicina e SMX-TMP, respectivamente (DIAS NETO *et al*, 2003a). Em ITU hospitalares, a resistência a ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino, gentamicina e SMX-TMP foi de 80%, 62%, 22%, 17% e 62%, respectivamente (DIAS NETO *et al*, 2003b). Estudo realizado em seis centros brasileiros entre 1998 e 1999, encontrou 47,8% de *E. coli* urinárias resistentes ao SMX-TMP, 11,5% à cefalotina e 6,4 % ao ciprofloxacino (OPLUSTIL *et al*, 2001).

3.5 Farmacocinética e farmacodinâmica da terapia antimicrobiana

A farmacologia da terapia antimicrobiana pode ser dividida em Farmacocinética e Farmacodinâmica. Absorção, distribuição e eliminação do fármaco combinados com o regime de doses, determinam o tempo das concentrações dos fármacos no soro e no sítio da infecção e com isso, a atividade. O curso do tempo da atividade antimicrobiana é um reflexo da relação entre farmacocinética e farmacodinâmica (CRAIG, 1998).

Alguns parâmetros farmacocinéticos devem ser levados em conta na escolha de um regime de posologia para determinar a eficácia do antimicrobiano. Para fármacos com atividade antimicrobiana concentração independente (ou pouco dependente) como os β -lactâmicos, o parâmetro farmacocinético mais importante é o tempo que a concentração do antibiótico permanece acima da MIC no sítio de

infecção, portanto a extensão de atividade antimicrobiana é largamente dependente do tempo de exposição. Para fármacos com atividade antimicrobiana concentração dependente como os aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, o pico de concentração do antibiótico (C_{max} , AUC/MIC ou C_{max}/MIC) é o parâmetro mais importante para o efeito *in vivo*. A razão C_{max}/MIC deve ser, no mínimo 10, num período de 24h e quanto maior a concentração, maior será a extensão da atividade antimicrobiana. Estes parâmetros devem ser utilizados para calcular a dose necessária de um antibiótico (CRAIG, 1998; FRIMODT-MOLLER, 2002a; FRIMODT-MOLLER, 2002b).

Desde os anos 60, dados da literatura levam à indicação que a eficácia dos antimicrobianos em ITU está ligada à presença de altas concentrações urinárias dos mesmos. Os argumentos da importância de altas concentrações de antibióticos na urina para inibição do crescimento ou erradicação das bactérias vêm de diferentes fontes. Pesquisas realizadas com penicilina, sulfonamidas e nitrofurantoína, que tinham baixa atividade *in vitro* contra *E.coli*, mas mostraram efeitos *in vivo* nas ITUs acentuaram a importância das altas concentrações urinárias dos antimicrobianos (FRIMODT-MOLLER, 2002b).

Agentes antimicrobianos para o tratamento de ITUs devem possuir rotas de excreção pelo trato urinário, originando concentrações na urina de 100 a mais de 1000 vezes a respectiva concentração no soro, e portanto maiores que a MIC para patógenos como a *E. coli*, mesmo que aparentemente sejam inativos *in vitro* (FRIMODT-MOLLER, 2002b; GASPARI & BOSKER, 2003; NICOLLE, 2003).

A taxa de eliminação do fármaco na urina está diretamente correlacionada com o *clearance* renal do mesmo. A excreção de fármacos pelos rins envolve processos como secreção e/ou reabsorção em diferentes partes do néfron, dependendo da estrutura molecular, pKA, pH no fluido tubular, ligação a proteínas, etc. O perfil farmacocinético de um antimicrobiano no soro ou plasma pode ser usado como marcador da taxa de eliminação na urina (FRIMODT-MOLLER, 2002b).

Para penicilinas e muitas cefalosporinas o sistema de transporte tubular para fármacos ácidos de tal forma eficiente que a secreção ativa no fluido tubular contribui para a sua eliminação. Uma vez no túbulo, estes ácidos fortes não são

reabsorvidos com o gradiente de concentração. Concentrações na urina maiores que 150 vezes as concentrações no sangue, são, dessa maneira, atingíveis (SOMMERS, 1983).

Os aminoglicosídeos, muito solúveis em água, são eliminados por filtração glomerular e sua concentração na urina é cerca de 50 vezes maior que no soro (SOMMERS, 1983).

Com o conhecimento de que a maioria dos antimicrobianos usados para o tratamento de ITUs atinge concentrações urinárias que excedem as concentrações séricas (nas quais são baseados os pontos de corte de susceptibilidade para muitos fármacos), é razoável esperar que nem todos os casos de resistência *in vitro* irão resultar em falha terapêutica (GASPARI & BOSKER, 2003; GUPTA *et al*, 2001a; GUPTA, 2003). Estudos encontraram taxas de cura bacteriológica e clínica de 50% e 60% respectivamente ao utilizar sulfametoxazol-trimetoprima (SMX-TMP) em pacientes com uropatógenos resistentes a estes fármacos (GUPTA *et al*, 2001a; GUPTA, 2003).

Assim sendo, muitos organismos definidos como resistentes pelo método de Kirby-Bauer podem ser erradicados do trato urinário se o fármaco for essencialmente eliminado pela via urinária, e as concentrações presentes na urina forem maiores que as sanguíneas. Embora as concentrações no plasma sejam pequenas, a grande reabsorção de água nos rins ocasiona altas concentrações urinárias (SOMMERS, 1983).

Desse modo, estes antimicrobianos podem alcançar níveis na urina que são maiores que a concentração inibitória mínima (MIC) dos microorganismos uropatogênicos e por isso a avaliação terapêutica da atividade deveria ser orientada para os níveis urinários, usando discos de alta potência, que refletiriam as concentrações alcançadas nesse sítio (SOMMERS, 1983).

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Meios de cultura:

- Mueller-Hinton ágar (Oxoid[®], Basingstoke, United Kingdom)
- Mueller-Hinton em placas (Biomérieux, Brasil S.A.)
- Mac Conkey em placas (Biomérieux, Brasil S.A.)
- Mueller-Hinton caldo (Oxoid[®], Basingstoke, United Kingdom)

Antimicrobianos:

- Discos de ciprofloxacino 5µg (Oxoid[®], Basingstoke, United Kingdom)
- Ampicilina anidra (Sigma Chemical Co[®] USA)
- Ampicilina injetável 1g (Amplatil[®], Novafarma)
- Cefalotina sódica teor: 932 µg/mg (Sigma Chemical Co[®] USA)
- Ciprofloxacino cloridrato teor 100,2% - padrão USP
- Gentamicina sulfato teor: 654 µg/mg (Sigma Chemical Co[®] USA)
- Sulfametoxazol (Sigma Chemical Co[®] USA)
- Trimetoprima (Sigma Chemical Co[®] USA)

Outros materiais

- Solução fisiológica estéril
- Água reagente tipo I
- caldo glicerol 16%
- tampão fosfato 0,1mol/L, pH 8,0
- tampão fosfato 0,1mol/L, pH 6,0
- Placas de Petri de vidro
- Inoculador de Steer (32 posições)

- cepa ATCC *E.coli* 25922
- discos de papel filtro (Cefar Diagnóstica)
- ácido láctico 0,05mol/L
- NaOH 2,5mol/L
- swabs estéreis

4.2 Métodos

4.2.1 Identificação e seleção das amostras

Foram utilizados 204 isolados bacterianos de *E.coli* provenientes de uroculturas realizadas na Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular (UMBM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e que se mostraram resistentes a um ou mais antimicrobianos utilizados neste estudo, segundo método de disco difusão (Kirby-Bauer) preconizado pelo CLSI.

As amostras foram selecionadas de acordo com o perfil de resistência apresentado no teste de susceptibilidade (antibiograma). Foram incluídas amostras com resistência a pelo menos um dos seguintes agentes: ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprima. As amostras, identificadas pela UMBM como *E.coli*, foram pesquisadas pelo laudo liberado no prontuário do paciente, no Sistema informatizado do HCPA para confirmar a resistência aos antimicrobianos em questão. No caso do antimicrobiano ciprofloxacino, o qual não é testado no antibiograma de urocultura do HCPA, foram selecionadas cepas resistentes a norfloxacino, e estas foram testadas frente ao ciprofloxacino através do método de disco difusão com disco de 5µg.

As amostras coletadas das placas de antibiograma (meio de cultura Mueller-Hinton), foram repicadas para o meio Mac Conkey a fim de garantir uma cultura pura. Após, esses isolados foram transferidos para tubos tipo eppendorf com caldo glicerol a 16% e congelados a -80°C , na Unidade de Pesquisa Biomédica (UPB) do Serviço de Patologia Clínica do HCPA.

4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Foi utilizada a técnica de diluição em ágar, como preconizado pelo NCCLS (NCCLS, 2003a). Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: gentamicina sulfato, ciprofloxacino cloridrato, ampicilina anidra, cefalotina sódica, sulfametoxazol e trimetoprima, que foram armazenados de acordo com as instruções do fabricante na UPB. Para a preparação das soluções estoque para determinação da MIC utilizou-se o esquema abaixo. Após homogeneização as soluções de ampicilina, cefalotina e ciprofloxacino foram alíquotadas em volumes de 2 mL, e as soluções de sulfametoxazol e trimetoprima em volumes de 1 mL. Estas foram congeladas a -20°C até sua utilização.

Ampicilina:

Foram pesados 0,256g de ampicilina anidra, que foram dissolvidos em tampão fosfato 0,1mol/L, pH 8,0. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1mol/L pH 6, em balão volumétrico de 10 ml. A concentração da solução mãe foi de 5,12mg/mL.

Cefalotina:

Foram pesados 0,1373g de cefalotina sódica (teor: 932 $\mu\text{g}/\text{mg}$), que foram solubilizados em tampão fosfato 0,1mol/L pH 6, em balão volumétrico de 25mL. Solução mãe: 5,12mg/mL.

Ciprofloxacino:

Foram pesados 0,0256g de ciprofloxacino cloridrato que foram solubilizados em água reagente tipo I, em balão volumétrico de 10mL. Solução mãe: 2,56mg/mL.

Gentamicina:

Foram pesados 0,03914g de gentamicina sulfato (teor: 654 $\mu\text{g}/\text{mg}$), que foram solubilizados em água reagente tipo I, em balão volumétrico de 10mL. Solução mãe: 2,56mg/mL.

Sulfametoxazol:

Foram pesados 2,432g de sulfametoxazol, que foram dissolvidos com $\frac{1}{2}$ volume de água quente e quantidade mínima de NaOH 2,5mol/L suficiente para dissolução. O volume foi completado com água reagente tipo I, em balão volumétrico de 50 ml. Solução mãe: 48,64 mg/mL.

Trimetoprima:

Foram pesados 0,128g de trimetoprima, que foram dissolvidos em ácido láctico 0,05mol/L (10% do volume final). O volume foi completado com água reagente, em balão volumétrico de 50 ml. Solução mãe: 2,56mg/mL.

Na preparação das diluições das soluções de antimicrobianos foram realizados cálculos para a obtenção das concentrações em um volume final de 20 mL. As soluções mãe de cada antimicrobiano foram diluídas 2x com seus respectivos diluentes para que fossem obtidas as diluições em placa nas faixas desejadas: 512 até 32 μ g/mL (ampicilina e cefalotina), 256 até 8 μ g/mL (gentamicina), 256 até 4 μ g/mL (ciprofloxacino) e 2436/128 até 152/8 μ g/mL (SMX/TMP).

Para a produção das placas com antimicrobianos, o meio de cultura Mueller Hinton foi preparado segundo as instruções do fabricante e aliqotado em volumes de 18mL em frascos de vidro, esterilizado por autoclavagem e armazenado em geladeira até seu uso. Para seu uso, o meio de cultura foi fundido em forno de microondas até sua completa liquefação. Quando este atingiu uma temperatura de aproximadamente 60°C, adicionou-se os 2mL da diluição do antimicrobiano fracionado anteriormente. Após homogeneização, o meio foi vertido em placa de Petri de vidro estéril de 90 mm de diâmetro.

As amostras armazenadas em caldo glicerol foram semeadas em meio de Mac Conkey e incubadas a 35°C \pm 2, por 16-20h para que se produzisse um crescimento viável para a realização dos testes. O inóculo foi preparado suspendendo-se colônias em solução fisiológica estéril, até uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 na escala de Mac Farland (1,5 x 10⁸UFC/mL). Após o ajuste da turbidez, esta suspensão foi diluída em solução fisiológica estéril em uma proporção de 1:10.

A suspensão bacteriana diluída em 1:10 foi aplicada através de um multi inoculador (inoculador de Steer) que liberou de 1 a 2 μ l da suspensão na superfície do meio de cultura. Após secar, as placas inoculadas foram incubadas por um período de 16-20h a 35°C \pm 2 em atmosfera ambiente. Placas foram examinadas sob fundo escuro e a menor concentração onde se visualizou a inibição do crescimento

foi registrada como a concentração inibitória mínima (MIC) do antimicrobiano para cada isolado. Como controle dos antimicrobianos, foi utilizada a cepa ATCC *E. coli* 25922, que foi inoculada em todas as realizações dos testes. Como controle de desempenho do ágar, uma placa contendo o meio, sem antimicrobiano foi inoculada e incubada juntamente com as placas teste.

4.2.3 Testes com disco de alta potência

A escolha das concentrações para os testes foi feita a partir da análise da bibliografia, onde se buscou as concentrações possíveis de serem atingidas pelos antimicrobianos na urina. A partir destes dados foram utilizados valores que ficassem situados entre os alcançados na urina, permitindo avaliar MIC relacionadas com concentrações urinárias. Estas concentrações foram utilizadas em discos de papel para testes de altas concentrações de antimicrobianos pelo método de disco difusão: ampicilina (500, 400 e 300µg), cefalotina (200 e 100µg), ciprofloxacino (200 e 150µg). Na execução destes testes, foram utilizados os mesmos antimicrobianos utilizados na diluição em ágar, com exceção da ampicilina, onde se utilizou a solução injetável.

Os antimicrobianos foram novamente pesados e solubilizados em balão volumétrico, resultando em soluções de 20 a 50µg/uL de acordo com cada antimicrobiano. Discos de papel de filtro estéreis foram impregnados individualmente com solução de antimicrobiano através de micropipeta. A concentração de antimicrobiano presente no disco foi avaliada e controlada pela eluição do conteúdo do disco produzido, em um volume definido de caldo Mueller Hinton. Esta solução foi utilizada para determinação da MIC frente à cepa padrão *E. coli* ATCC 25922, através de teste de diluição em caldo. Para isso, cada disco impregnado foi colocado em 1mL de caldo Mueller Hinton e deixado em repouso por cerca de uma hora para que houvesse eluição do antimicrobiano para o caldo. A partir deste caldo, foram feitas diluições, que foram inoculadas com a cepa *E. coli* ATCC 25922. Para monitoramento da reprodutibilidade dos discos, cada rodada de experimentos foi acompanhada por uma determinação do diâmetro de halo da cepa *E. coli* ATCC 25922 frente aos discos produzidos.

Com os discos de alta potência, foi realizado o método de Kirby-Bauer (disco-difusão) no qual um inóculo padronizado (0,5 McFarland) do organismo foi aplicado com *swab* sobre a superfície da placa de meio de cultura Mueller-Hinton. Os discos de alta potência foram colocados sobre o ágar inoculado, e após incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 16-18 horas, o diâmetro da zona de inibição (halo) ao redor de cada disco foi medido (NCCLS, 2003b)

4.2.4 Análise estatística dos dados

Utilizou-se o teste de Spearman para avaliar o grau de correlação entre as variáveis MIC e diâmetro de halo (Sigmastat 3.5). Para a sugestão de pontos de corte, utilizou-se a curva ROC (*receiver operating characteristic*) através do programa SPSS 11.0 para Windows.

5.RESULTADOS

5.1. Controle do teor dos discos de alta potência

As MIC, determinadas através da eluição do conteúdo dos discos de cada antimicrobiano frente a cepa ATCC *Escherichia coli* 25922, ficaram dentro dos limites estabelecidos pelo CLSI (ampicilina 8µg/mL, cefalotina 16 µg/mL, ciprofloxacino 0,004 µg/mL). Assim, os discos de alta potência foram validados para uso nos testes de disco-difusão.

A reprodutibilidade dos discos foi controlada frente à cepa ATCC a cada rodada de determinações de halo com discos de alta potência. A variação dos halos nos testes foi de ± 3 mm para os discos de ampicilina, ± 2 mm para os discos de cefalotina e ± 1 mm para os discos de ciprofloxacino. Estas variações não foram maiores que as aceitas pelo CLSI para os discos de concentração padrão utilizados na rotina.

5.2 Testes com os antimicrobianos

5.2.1. AMPICILINA

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Um total de 144 das 204 amostras de *E. coli* demonstraram resistência a ampicilina no teste de disco-difusão convencional. Foi determinada a MIC de ampicilina para cada um destes 144 isolados utilizando as seguintes concentrações do antimicrobiano: 512, 256, 128, 64 e 32 µg/mL, visto que a concentração de 32 µg/mL corresponde à primeira na faixa de resistência estabelecida pelo CLSI.

A figura 1 mostra a distribuição de cada MIC para as 144 amostras de *E. coli* resistentes a ampicilina pela concentração utilizada no método usual de disco difusão segundo o CLSI.

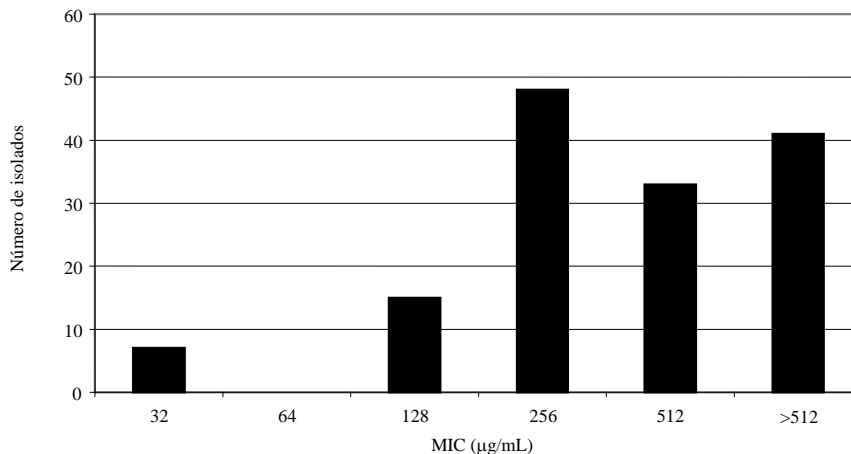


Figura 1. Distribuição da MIC para ampicilina em 144 isolados de *E. coli* resistentes no teste de disco-difusão convencional

A ampicilina apresentou MIC de até 256 µg/mL para cerca de 50% (70 isolados) das amostras analisadas sendo que para o restante (74 isolados) a ampicilina apresentou MIC de valor igual ou maior que 512µg/mL, ou seja, estes últimos eram resistentes a altos níveis de ampicilina.

Testes com discos de alta potência:

Devido ao fato das concentrações de ampicilina atingidas na urina variarem numa faixa de 250 a 1000 µg/mL, foram escolhidas 3 concentrações para teste com os discos de alta potência, buscando a que melhor discriminasse as amostras como resistentes ou susceptíveis admitindo como ponto de corte 256µg/mL ($R > 256$ e $S \leq 256$), adotado porque é possível atingir esta concentração na urina. Foram utilizados discos com concentração de 500, 400 e 300 µg de ampicilina.

Disco de 500 µg de ampicilina

A figura 2 mostra a distribuição dos diâmetros de halo obtidos com disco de 500µg de ampicilina, em função da MIC. O coeficiente de correlação obtido através do teste de Spearman foi $r_s: -0,659$ ($p < 0,001$).

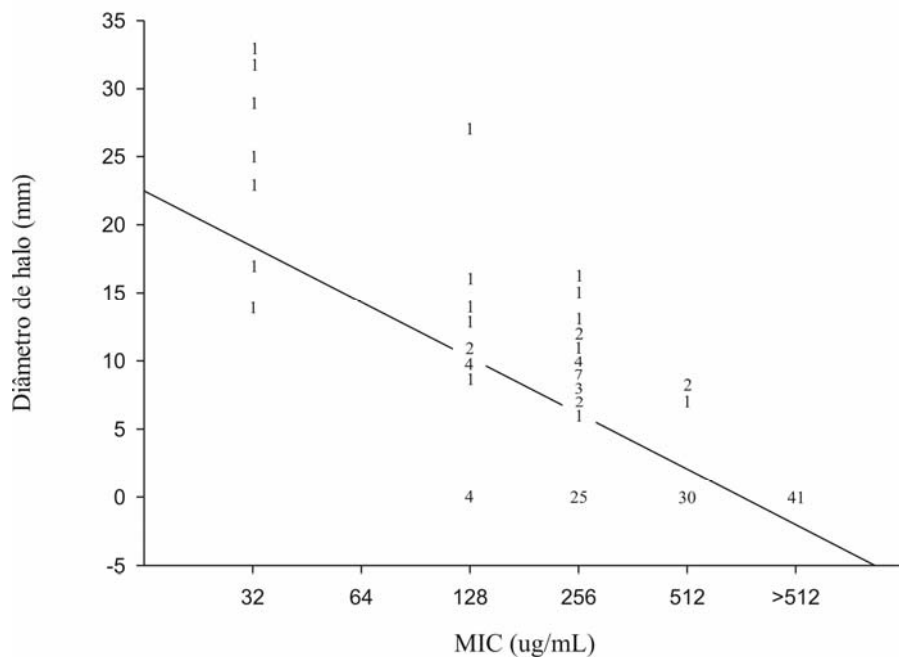


Figura 2. Distribuição de MIC x Halo para disco de 500µg de ampicilina

Disco de 400 µg de ampicilina

A figura 3 mostra a distribuição dos diâmetros de halo obtidos com disco de 400µg de ampicilina, em função da MIC. O coeficiente de correlação obtido através do teste de Spearman foi $r_s: -0,654$ ($p < 0,001$).

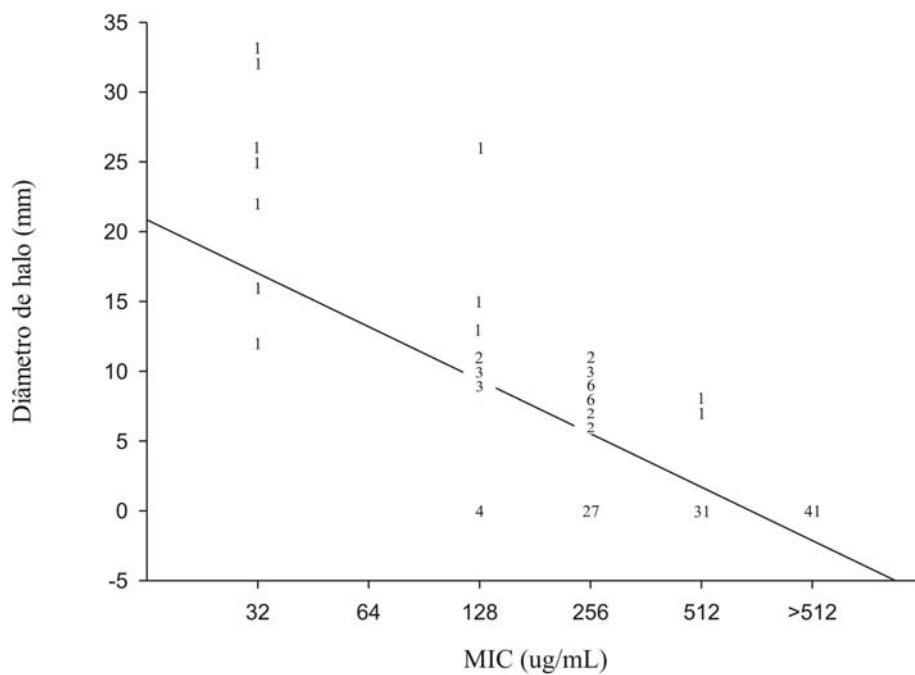


Figura 3. Distribuição de MIC x Halo para disco de 400µg de ampicilina

Disco de 300 µg de ampicilina

A figura 4 mostra a distribuição dos diâmetros de halo obtidos com disco de 300µg de ampicilina, em função da MIC. O coeficiente de correlação obtido através do teste de Spearman foi $r_s: -0,570$ ($p < 0,001$).

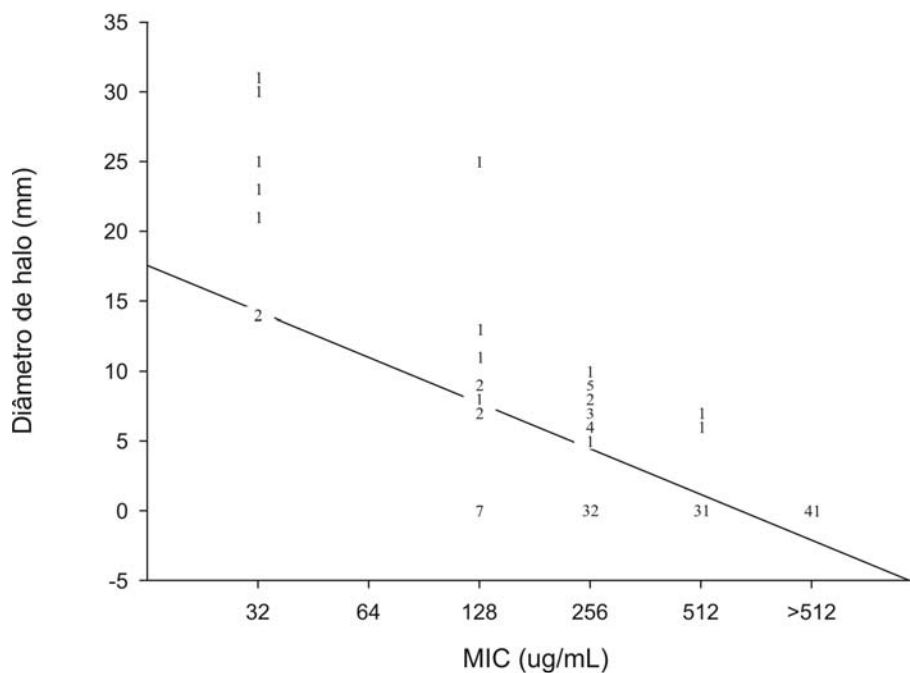


Figura 4. Distribuição de MIC x Halo para disco de 300µg de ampicilina

Determinação do ponto de corte do halo de inibição

Através da análise das concentrações atingidas na urina, halos produzidos com cada concentração de disco e coeficiente de correlação, foi proposto o ponto de corte com melhor sensibilidade e especificidade, obtido através da curva ROC.

O disco contendo 500 μ g de ampicilina apresentou melhor coeficiente de correlação ($r_s:-0,659$). A curva ROC, dividindo as amostras entre R (MIC>256) e S (MIC \leq 256), mostrou que a área sob a curva, que mede a exatidão do teste, foi de 0,782 (figura 5).

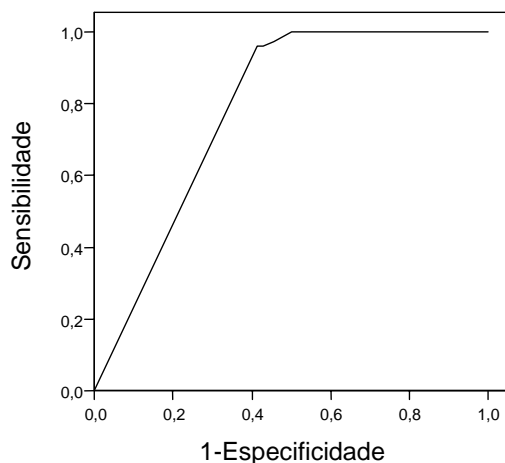


Figura 5. Curva ROC para MIC x Halos com disco contendo 500 μ g

Conforme os dados das coordenadas da curva (anexo I), observou-se a melhor relação sensibilidade versus especificidade utilizando um diâmetro de halo de 9 mm com o disco contendo 500 μ g. Neste caso a sensibilidade foi de 100% e a especificidade de 50%. Para medidas de halo com diâmetros maiores, não houve grande variação na sensibilidade, porém a especificidade diminuiu. Nestas condições, amostras de *E. coli* que apresentaram diâmetro de halo \geq 9mm, com o disco de 500 μ g poderiam seguramente ser consideradas susceptíveis a altos níveis de ampicilina.

5.2.2 CEFALOTINA

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Do total de 204 isolados bacterianos, 83 apresentaram resistência a cefalotina. A MIC de cada um dos isolados resistentes a cefalotina foi determinada utilizando as seguintes concentrações de antimicrobiano: 512, 256, 128, 64 e 32 $\mu\text{g/mL}$. A figura 6 mostra a distribuição da MIC nos 83 isolados de *E. coli* urinárias resistentes a cefalotina pelo método de disco-difusão padronizado pelo CLSI.

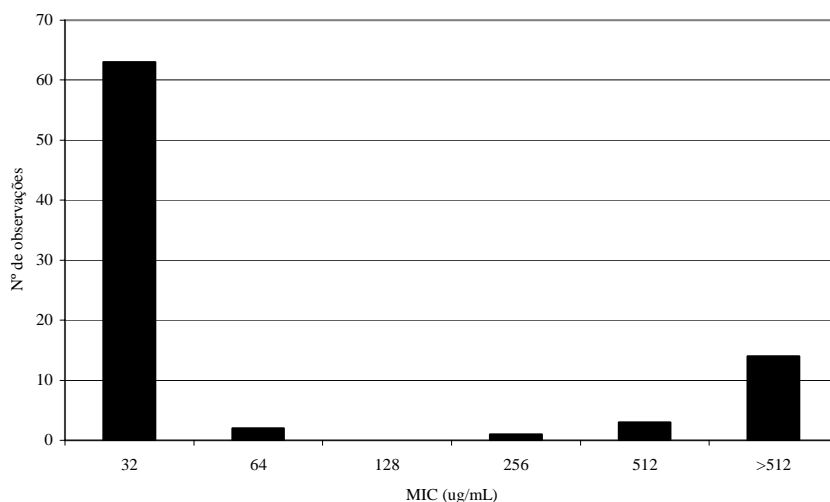


Figura 6. Distribuição da MIC para cefalotina em 83 isolados de *E. coli* urinárias

A cefalotina apresentou MIC inferior a 256 $\mu\text{g/mL}$ para a maioria dos isolados (65 isolados ou 78%), o que demonstra um baixo nível de resistência a cefalotina nas amostras estudadas.

Testes com disco de alta potência

Devido ao fato das concentrações de cefalotina atingidas na urina variarem numa faixa de 800 a 2500 $\mu\text{g/mL}$, e da maioria das amostras terem valores de MIC inferiores a 256 $\mu\text{g/mL}$ foram escolhidas as concentrações de 100 e 200 μg de

cefalotina para o teste com os discos de alta potência, para determinar a concentração que melhor discriminasse os isolados como resistentes ou susceptíveis admitindo como ponto de corte 256µg/mL ($R \geq 256$ e $S < 256$).

Disco de 200 µg de cefalotina

A figura 7 mostra a distribuição dos isolados no gráfico diâmetro de halo (mm) e MIC (µg/mL). O coeficiente de correlação encontrado através do teste de Spearman foi $r_s: -0,744$ ($p < 0,001$).

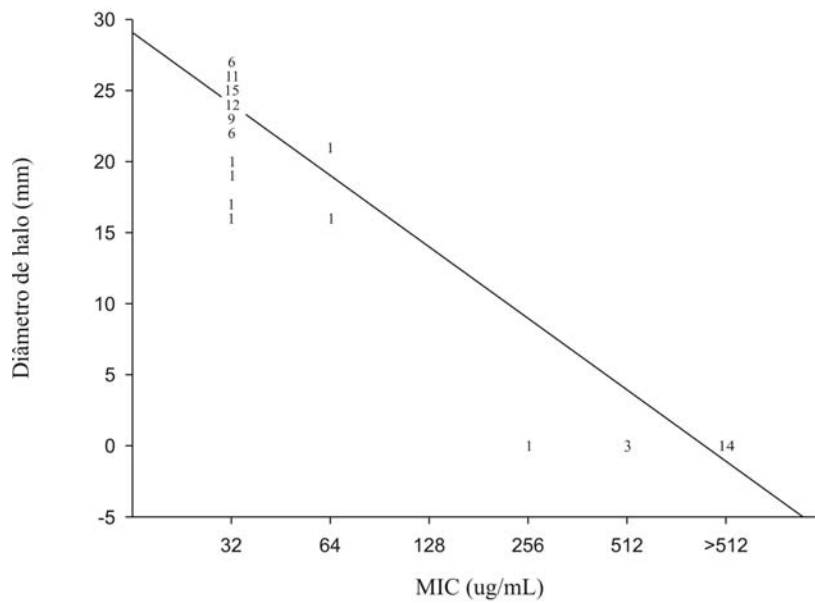


Figura 7. Distribuição de MIC x Halo para disco de 200µg de cefalotina

Disco de 100 µg de cefalotina

A figura 8 mostra a distribuição dos diâmetros de halo obtidos com disco de 100µg de cefalotina, em função da MIC. O coeficiente de correlação obtido através do teste de Spearman foi $r_s: -0,744$ ($p < 0,001$).

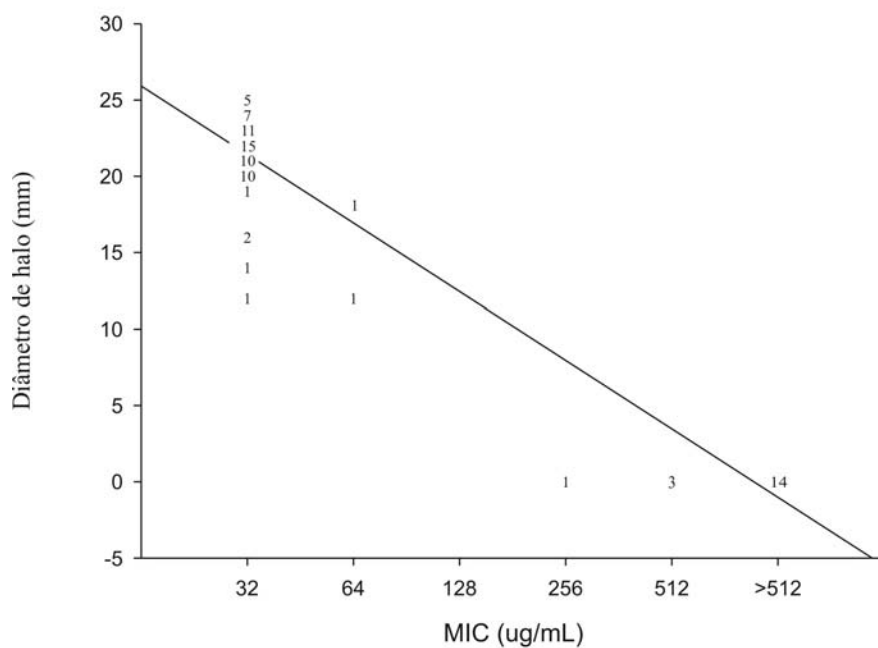


Figura 8. Distribuição de MIC x Halo para disco de 100µg de cefalotina

Determinação do ponto de corte do halo de inibição

Sendo os valores de coeficiente de correlação iguais, foi confeccionada uma curva ROC para as duas concentrações de disco. O ponto de corte escolhido para dividir as populações foi MIC de 256 µg/mL.

A figura 9 mostra as curvas ROC sobrepostas para os discos de 200 e 100 µg de cefalotina. A área sob a curva ROC das duas concentrações foi 1,000.

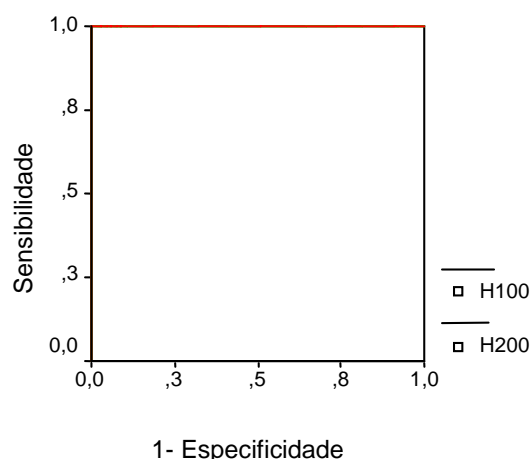


Figura 9. Curvas ROC para MIC x Halos com disco de 100 µg e 200 µg de cefalotina

Para o disco de 200 µg de cefalotina, considerando um halo de 17 mm, as amostras resistentes ($MIC \geq 256 \mu\text{g/mL}$) seriam separadas das susceptíveis ($MIC < 256 \mu\text{g/mL}$) com 100% de sensibilidade e 96,9% de especificidade. Para o disco de 100 µg, o ponto de corte para conservar a mesma sensibilidade e especificidade seria de 13 mm (anexo II).

5.2.3. CIPROFLOXACINO

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Dos 204 isolados, 68 apresentaram resistência ao ciprofloxacino. A MIC para estes isolados foi determinada utilizando as concentrações de 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 $\mu\text{g/mL}$ de ciprofloxacino.

A figura 10 mostra a distribuição da MIC nos 68 isolados de *E. coli* resistentes ao ciprofloxacino (disco difusão convencional).

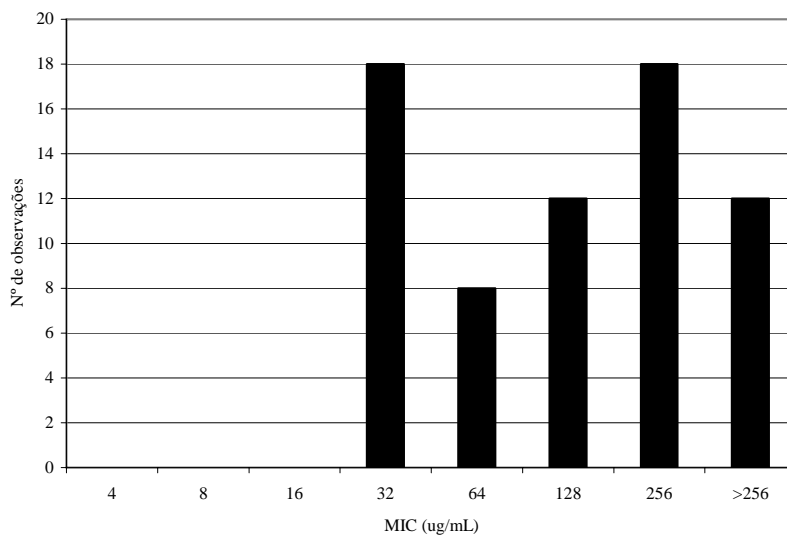


Figura 10. Distribuição da MIC para ciprofloxacino em 68 isolados de *E. coli* urinárias resistentes ao ciprofloxacino

Observa-se que nenhum isolado apresentou resistência a baixos níveis de ciprofloxacino, todas as MIC foram superiores a $16\mu\text{g/mL}$. A MIC foi menor ou igual a $128\mu\text{g/mL}$ em mais de 50% dos isolados ($n=38$), ou seja estes eram susceptíveis à concentração possível de ser atingida na urina.

Testes com disco de alta potência

As concentrações de ciprofloxacino atingidas na urina variam numa faixa de 200 a 350 $\mu\text{g/mL}$, tendo sido escolhidas as concentrações de 150 μg e 200 μg de ciprofloxacino para teste com os discos de alta potência. Admitindo que a concentração alcançada na urina seja no mínimo 200 $\mu\text{g/mL}$, o ponto de corte selecionado foi de 128 $\mu\text{g/mL}$. Assim, amostras com MIC do ciprofloxacino ≤ 128 $\mu\text{g/mL}$ foram consideradas susceptíveis e as com MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$, resistentes.

Disco de 200 μg de ciprofloxacino

A figura 11 mostra a distribuição das amostras no gráfico relacionando diâmetro de halo (mm) com MIC ($\mu\text{g/mL}$) nos 68 isolados. O coeficiente de correlação encontrado através do teste de Spearman foi $r_s: -0,916$ ($p < 0,001$).

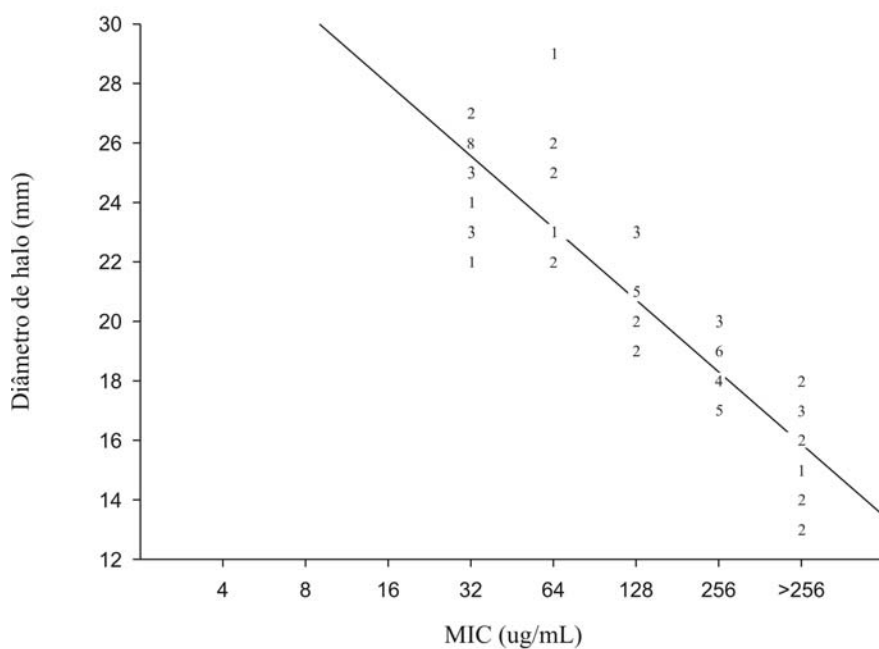


Figura 11. Distribuição de MIC x Halo para disco de 200 μg de ciprofloxacino

Disco de 150 µg de ciprofloxacino

A figura 12 mostra a distribuição das amostras no gráfico diâmetro de halo (mm) x MIC em 47 isolados. O coeficiente de correlação encontrado através do teste de Spearman foi r_s : -0,896 ($p < 0,001$).

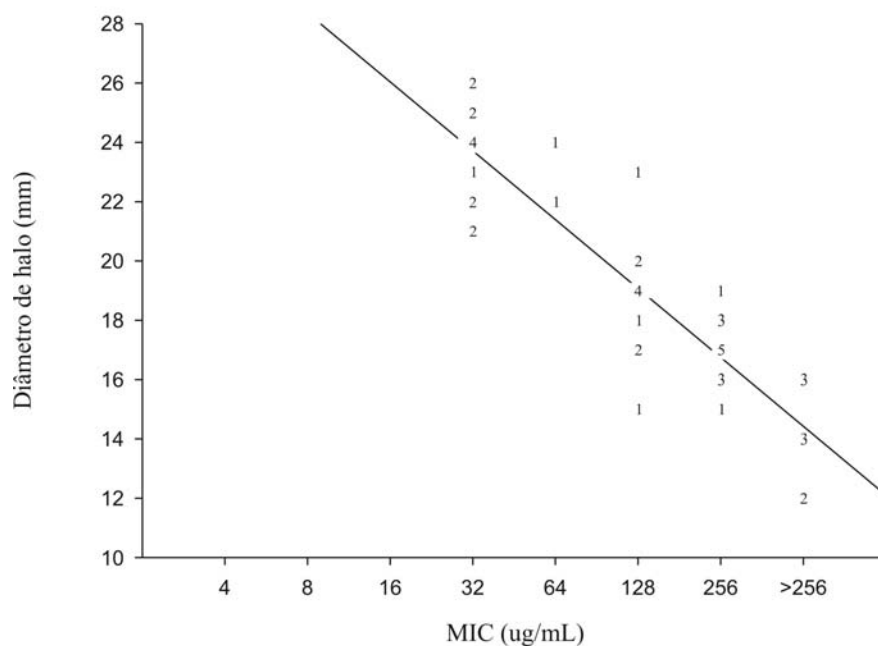


Figura 12. Distribuição de MIC x Halo para disco de 150µg de ciprofloxacino

Determinação do ponto de corte do halo de inibição

Embora ambos os discos tenham coeficiente de correlação semelhantes, o disco de 200µg de ciprofloxacino mostrou um coeficiente de correlação superior, tendo sido selecionado como disco de trabalho para determinação do ponto de corte através da curva ROC. A variável MIC foi dicotomizada considerando MIC > 128µg/mL como resistente.

A figura 13 mostra a curva ROC para o disco de 200µg de ciprofloxacino. A área sob a curva obtida foi de 0,978.

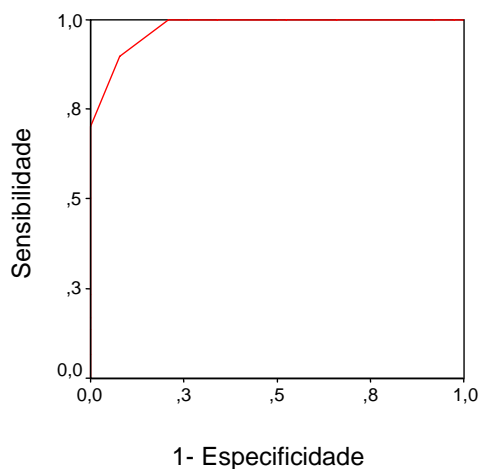


Figura 13. Curva ROC para MIC x Halos com disco de 200 µg de ciprofloxacino

Pelas coordenadas da curva (anexo III), um ponto de corte de halo de 21mm separaria as amostras resistentes ($MIC > 128 \mu\text{g/mL}$) das susceptíveis ($MIC \leq 128 \mu\text{g/mL}$) com 100% de sensibilidade e 78,9% de especificidade. Um halo de 20mm faria a distinção com 90% de sensibilidade e 92,1% de especificidade.

5.2.4 COTRIMOXAZOL

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Foi determinada a MIC da combinação sulfametoxazol-trimetoprima (cotrimoxazol) nos 129 isolados de *E. coli* resistentes ao cotrimoxazol utilizando as seguintes concentrações do antimicrobiano: 128/2432, 64/1216, 32/608, 16/304, 8/152 µg/mL (TMP/SMX).

A figura 14 mostra a prevalência de cada MIC nos 129 isolados de *E. coli* resistentes ao cotrimoxazol pelo método de disco difusão, segundo o CLSI.

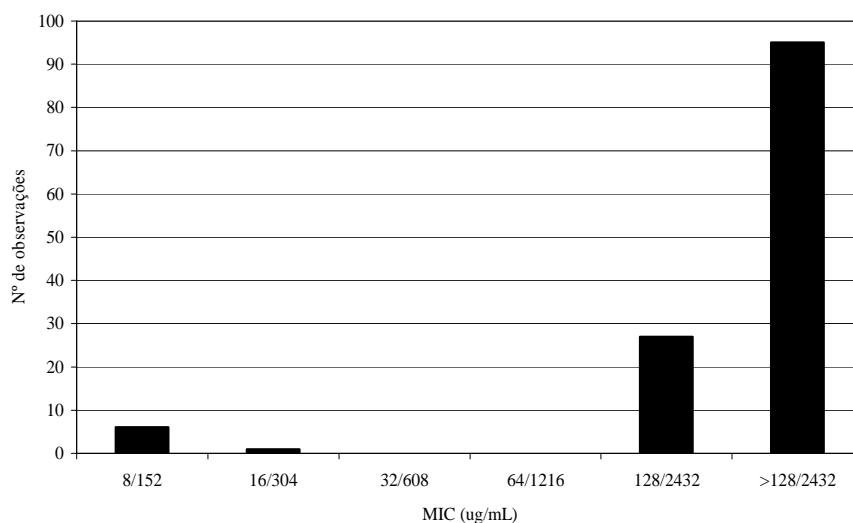


Figura 14. Distribuição da MIC para sulfametoxazol-trimetoprim (SMX-TMP) em 129 isolados urinários de *E. coli* resistentes ao cotrimoxazol

Como se observa, 95% dos isolados testados mostraram alto nível de resistência ao cotrimoxazol, fato que inviabilizou o teste com discos de alta potência, pois as concentrações a que as amostras seriam sensíveis não seriam atingidas na urina.

5.2.5 GENTAMICINA

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Foi determinada a MIC de gentamicina para cada um dos 22 isolados de *E. coli* resistentes a este antimicrobiano utilizando as seguintes concentrações do antimicrobiano: 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL. As concentrações atingidas na urina após administração de doses usuais do agente variam de 100 a cerca de 400µg/mL.

A figura 15 mostra a prevalência de cada MIC no total de 22 amostras de *E. coli* resistentes a gentamicina pelo método de disco difusão, segundo o CLSI.

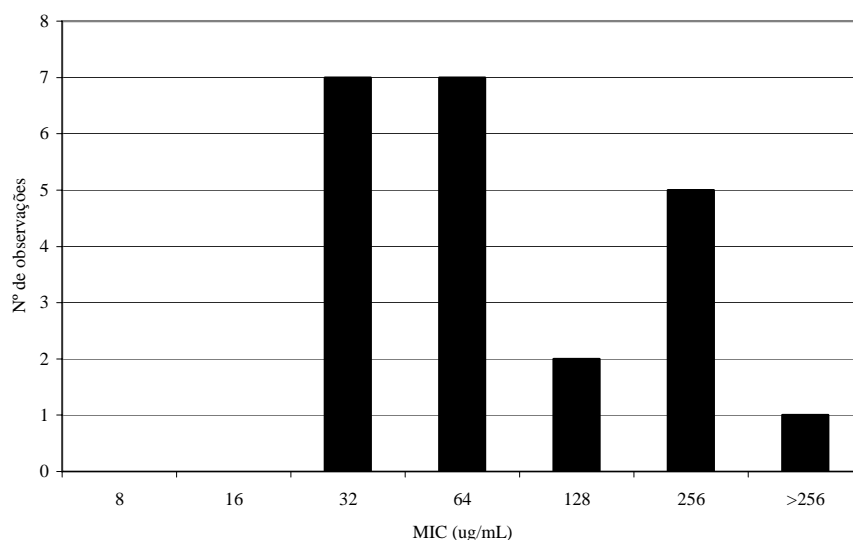


Figura 15. Distribuição da MIC para gentamicina em 22 isolados de *E. coli* urinárias resistentes a gentamicina

A gentamicina apresentou MIC<128µg/mL na maioria das amostras analisadas (n=14 ou 63%), sendo que estas seriam consideradas como susceptíveis às concentrações urinárias alcançadas pela gentamicina. Devido ao pequeno número de isolados resistentes no teste de disco-difusão, não foram realizados testes com discos de alta potência para este antimicrobiano.

6.DISSCUSSÃO

Infecções no trato urinário estão entre as infecções mais comuns, sendo a *E. coli* o principal microorganismo causador (KUNIN 1997). Os antimicrobianos mais empregados para o tratamento de infecções do trato urinário incluem os antimicrobianos β -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfametoxazol-trimetoprima ou cotrimoxazol (WAREN,1998), entretanto, não é possível prever a susceptibilidade da família *Enterobacteriaceae* aos antimicrobianos, ainda mais devido ao aumento de resistência nos últimos anos (GUPTA *et al*, 2001a; BROWN, 2002). Assim, é necessário realizar testes de susceptibilidade específicos para a bactéria causadora da infecção urinária em questão. Os testes de susceptibilidade mais utilizados em rotina são os testes de disco-difusão, que são padronizados por órgãos internacionais, sendo mais adotada no Brasil a padronização do CLSI (ROSSI & ANDREAZZI, 2005). Esta padronização utiliza discos impregnados com antimicrobianos, em concentrações que refletem as concentrações alcançadas na corrente sanguínea por doses usuais do antimicrobiano. As tabelas de interpretação, por sua vez, também se referem a concentrações sanguíneas.

Excluído: .

Em virtude da utilização de padronização de concentrações séricas, estes testes podem não ter boa correlação quando se trata de patógenos de infecções urinárias, porque se verifica que na urina alguns antimicrobianos são concentrados durante o processo de eliminação e que, por este motivo atingem altos níveis de concentração neste sítio, superando os valores de concentração sanguínea. Dessa forma, o teste de susceptibilidade utilizado na rotina não reflete a real condição obtida no sítio urinário, e isso vale principalmente para infecções como cistite, não complicadas. Assim, a melhor maneira de determinar a real susceptibilidade aos antimicrobianos para isolados de infecção urinária, é a determinação da MIC para cada uropatógeno. No entanto este método é inviável na rotina laboratorial, por ser trabalhoso, e ter maiores custos, inclusive para os testes de controle de qualidade.

Realizando o teste para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), uma grande parcela dos microrganismos isolados de urina poderia responder ao tratamento com o antimicrobiano embora fossem resistentes pelo método de disco difusão (SOMMERS, 1983). Em concordância, neste estudo foi observado que mais de metade das amostras poderia ser inibida pelo antimicrobiano considerado resistente no teste convencional, com concentrações atingíveis no trato urinário.

Assim sendo, para viabilizar um teste com concentrações correspondentes às alcançadas na urina, que possibilitasse uma melhor avaliação de susceptibilidade e permitisse sugestão de antimicrobianos para uso em bactérias isoladas na urina, foi proposta a utilização de discos com potência mais elevada. Baseado nas concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos fármacos para dos uropatógenos, foram produzidos discos de alta potência (correlacionadas as concentrações urinárias) com antimicrobianos freqüentemente utilizados para tratamento de infecção urinária. Foram testados ampicilina, cefalotina e ciprofloxacino. Testes com discos de sulfametoxazol-trimetoprima não foram realizados porque os isolados estudados eram verdadeiramente resistentes, ou seja, a concentração necessária para inibir as bactérias estudadas era maior que as atingidas no trato urinário. Testes com discos de gentamicina também não foram realizados devido ao pequeno número de isolados resistentes a este antimicrobiano.

Em primeiro lugar, foi necessário verificar se os discos confeccionados realmente haviam absorvido a solução de antimicrobiano, isto é, se possuíam as concentrações desejadas. A concentração dos discos de alta potência foi avaliada com testes que permitiram comprovar que o teor dos discos produzidos estava dentro dos valores desejados. Em concordância com estes resultados, um estudo anterior também avaliou a eluição de antimicrobiano a partir de discos com concentração convencional e encontrou resultado satisfatório (Pagel F.; Monografia de Conclusão do Curso de Especialização em Análises Clínicas UFRGS/HCPA).

Ampicilina

Na determinação da MIC da ampicilina verificou-se que mais de metade dos isolados de *E. coli* testados neste estudo poderia responder o tratamento com este

antimicrobiano para infecções do trato urinário, admitindo que a concentração neste sítio alcance 300 µg/mL. Isto é muito provável já que segundo Kunin (1987), a concentração de ampicilina na urina varia entre 250 e 1000 µg/mL.

Embora as taxas de resistência de *E.coli* a ampicilina sejam altas, em média 35% na América do Norte e Europa (KARLOWSKY *et al*, 2002, SAHM *et al*, 2001, RONALD, 2002, ZHANEL *et al*, 2006, KAHLMETER, 2003) e de cerca de 60% no Brasil (GALES, 2002, DIAS NETO *et al*, 2003a, OPLUSTIL *et al*, 2001), este estudo mostrou que ainda seria possível a utilização deste fármaco para o tratamento das infecções urinárias não complicadas em parcela significativa dos pacientes. Deve-se ressaltar, entretanto, a importância de um regime de doses calculado de modo a manter a concentração acima da MIC o máximo de tempo possível, parâmetro farmacocinético associado a este fármaco (RYBAK, 2006).

Nos testes com os discos com alta potência, foram utilizadas as concentrações de disco de 300, 400 e 500µg, buscando determinar a que melhor correlacionasse a MIC com os diâmetros de halo dos testes de difusão. No teste de correlação com o disco de 500µg se obteve um valor de r_s : 0,659 ($p < 0,001$), sendo pois superior aos testes com as outras concentrações. Além disso, os halos observados nos testes com esta concentração também mostraram adequação quanto a serem bem delimitados e terem tamanho de mensuração mais fácil do que os obtidos nas demais concentrações testadas. Por estes motivos, foi escolhido o disco de 500µg para estabelecer um ponto de corte para utilização em testes de disco difusão com discos de alta potência para isolados bacterianos de urina.

Para determinar o ponto de corte no diâmetro do halo procurou-se um valor que privilegiasse a detecção de todos os casos de resistência (100% sensibilidade), sendo aceito a não detecção de casos de susceptibilidade (menor especificidade). Isso porque foi considerado que um falso resultado de sensibilidade pode ter maior repercussão clínica, sugerindo a escolha de agente antimicrobiano ineficaz. O oposto, por sua vez, poderia deixar de considerar um agente útil, o que embora possa ter repercussão epidemiológica, não leva ao tratamento inadequado.

Em posse dos diâmetros de halo obtidos com o disco de 500 μ g e dos valores de MIC, foi traçada a curva ROC após dicotomização dos valores de MIC, considerando amostras com MIC > 256 μ g/mL resistentes a altos níveis de ampicilina, e susceptíveis as com MIC \leq 256 μ g/mL. Neste momento o tamanho do halo de inibição foi uma variável importante, uma vez que halos muito pequenos não podem ser adequadamente medidos. Considerando os diâmetros de halo com valores mensuráveis, as coordenadas da curva mostraram boa sensibilidade mas baixa especificidade (anexo I). Embora fosse desejável utilizar diâmetros de halo em torno de 20 mm, isso não foi possível, porque quanto maior o diâmetro de halo escolhido para ponto de corte, menor a especificidade. Isso se deve, ao grande número de amostras com MIC susceptíveis a ampicilina na urina, que não seriam detectadas pelo método de disco de alta potência proposto, como mostrado na figura 2 dos resultados. Já nas amostras consideradas resistentes pela MIC (> 256 μ g/mL) apenas em 3 casos o diâmetro do halo foi mensurável.

A partir destes dados, o diâmetro do halo de inibição de 9 mm foi escolhido como ponto de corte que melhor distinguiu as amostras resistentes (halo<9mm) das susceptíveis (halo \geq 9mm). Entretanto, o disco de 500 μ g detectou apenas 35 dos 70 isolados com MIC susceptível, o que é considerado uma baixa especificidade. Por outro lado, todos os isolados resistentes foram adequadamente identificados (100% de sensibilidade). Também não foi possível afirmar com segurança a resistência no teste com disco de 500 μ g, pois muitas das amostras com halo menor que 9 mm tinham, na verdade, MIC consideradas susceptíveis para o trato urinário.

Mesmo que não tenha sido possível definir um ponto de corte para distinção segura das amostras resistentes e susceptíveis, a possibilidade de determinar que parte destas amostras poderiam ser tratadas com ampicilina foi importante, uma vez que todas haviam sido consideradas resistentes pelo método convencional de disco difusão.

Cefalotina

Na determinação da MIC para cefalotina, foi observado que 78% dos 83 isolados testados apresentou um nível baixo de resistência a cefalotina e que suas

MIC ficaram em sua maioria no valor de 32 µg/mL. Este valor corresponde ao ponto inferior da faixa de resistência a cefalotina segundo a norma M100-S16 do CLSI (CLSI, 2005). Novamente, com estes valores de MIC, é provável que uma infecção urinária causada por *E. coli* responda ao tratamento com cefalotina, pois segundo a bibliografia, a concentração que este fármaco alcança na urina é bem maior que as MIC encontradas, variando de 800 a 2500 µg/mL (KUNIN, 1987; MARTINDALE, 1999).

Desta forma, embora a prevalência de resistência à cefalotina varie de 16 até 55% (BROWN *et al*, 2002; SAHM *et al*, 2001), este fármaco poderia ser uma opção para tratamento de cerca de 80% dos pacientes com *E. coli* resistentes ao antibiótico, considerando susceptíveis os isolados com MIC <256µg/mL. Isso é significativo porque poderia restringir o uso de antimicrobianos com maior espectro, também minimizando a emergência de resistência. Assim como para a ampicilina, o tempo que a concentração do fármaco permanece acima da MIC é o parâmetro farmacocinético mais importante, e pode ser monitorado com o controle da posologia (RIBAK, 2006).

Com o intuito de viabilizar o teste laboratorial com concentrações correlacionadas a níveis urinários dos antimicrobianos e a partir da análise das MIC obtidas, foram escolhidas as concentrações de 100 e 200 µg de cefalotina, buscando discriminar isolados com MIC < 256 µg/mL, considerados susceptíveis a altos níveis de cefalotina dos isolados com MIC ≥ 256 µg/mL, considerados resistentes.

Nos testes com os discos de alta potência de 100 e 200 µg , todos os isolados que apresentaram MIC ≥ 256µg/mL tiveram diâmetro de halo igual a zero, confirmando claramente a resistência. As duas concentrações de cefalotina (100 e 200µg) mostraram o mesmo valor de coeficiente de correlação: -0,744. Por este motivo, a curva ROC foi traçada para ambas concentrações, considerando MIC<256 µg/mL como susceptível e MIC ≥ 256 µg/mL como resistente a altos níveis de cefalotina.

Pelas coordenadas da curva ROC, foi observado que um diâmetro de halo de 17mm obtido com o disco de 200µg de cefalotina, separaria os isolados resistentes (MIC \geq 256 µg/mL) dos susceptíveis (MIC < 256 µg/mL) com 100% de sensibilidade e 96,9% de especificidade (anexo II). Já com o disco de 100 µg, um diâmetro de halo de 13 mm faria a discriminação com a mesma sensibilidade e especificidade. Assim sendo, escolheu-se como disco mais adequado o de 200 µg, pois um halo de 17 mm é mais fácil de ser medido na rotina do laboratório, cabendo salientar que a escolha do disco com menor concentração também seria adequada em termos de sensibilidade e especificidade.

Desta forma, *E. coli* isolados de urina que mostrem um halo igual ou maior que 17mm frente a um disco de 200 µg de cefalotina, podem ser consideradas susceptíveis a altos níveis de cefalotina, permitindo o tratamento com segurança nos pacientes com infecção urinária não-complicada.

Ciprofloxacino

Para este antimicrobiano, nenhum isolado apresentou valores de MIC situados nas primeiras faixas de resistência estabelecidas pelo CLSI. O menor valor de MIC obtido foi de 32 µg/mL, o que mostra que a resistência ao ciprofloxacino tende a ser de maior magnitude quando comparado aos outros antimicrobianos, principalmente os β -lactâmicos testados. Pelo fato do ciprofloxacino atingir concentrações de até 350 µg na urina (AHFS, 2000; GUPTA *et al*, 2001a), e analisando a distribuição das MIC obtidas, foi estipulado que um valor de MIC de 128 µg/mL seria o ponto de corte que melhor separaria os isolados susceptíveis (MIC \leq 128 µg/mL) dos resistentes (MIC > 128 µg/mL), admitindo que a concentração deste fármaco na urina atingisse no mínimo 200 µg/mL. Assim, mais de 50% dos isolados (n=38) poderiam ser considerados susceptíveis a altos níveis de ciprofloxacino, pois as MIC deste antimicrobiano tiveram valor igual ou inferior a 128 µg/mL,

Para os testes com discos de alta potência, foram utilizados discos com 150 e 200 µg de ciprofloxacino. O coeficiente de correlação obtido com o disco de 150 µg

foi de $r:-0,896$, e com o disco de 200 μg , $r:-0,916$, levando à conclusão de que o disco de 200 μg tinha um melhor desempenho, tendo sido escolhido para traçar a curva ROC e estabelecer um ponto de corte em diâmetro de halo. Nos testes com discos de ciprofloxacino, diferentemente dos demais antimicrobianos, nenhum isolado apresentou diâmetro de halo igual a zero, sendo que o menor halo detectado foi de 12 mm com disco de 150 μg e 13 mm com disco de 200 μg .

Para a obtenção da curva ROC, a variável MIC foi dividida, e os isolados com valores de MIC maiores que 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram considerados resistentes, e os com MIC igual ou menores que 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, susceptíveis a altos níveis de ciprofloxacino. As coordenadas da curva mostram que para o disco de 200 μg , um diâmetro de halo de 21 mm faria a distinção entre resistentes e susceptíveis com 100% de sensibilidade e 78,9% de especificidade. Um halo de 20mm separaria os isolados com 90% de sensibilidade e 92,1% de especificidade (anexo III). Novamente aqui, foi priorizada a sensibilidade, pois tais isolados já tinham sido considerados resistentes pelo método de disco difusão convencional utilizado na rotina do laboratório, o que inibiria seu uso nos pacientes. Embora a prevalência da resistência de *E. coli* ao ciprofloxacino ainda não tenha atingido grandes proporções, o que se nota é que uma lenta ascensão da resistência através dos anos (KARLOWSKY *et al*, 2002), impulsionada pelo consumo excessivo de quinolonas, sendo estas utilizadas muitas vezes como primeira linha nas infecções urinárias (KILLGORE *et al*, 2004; GASPARI & BOSKER, 2003).

Desta forma, sendo priorizado um regime de dose adequado, de modo a manter altos valores de concentração acima da MIC no sítio urinário, o uso de ciprofloxacino pode ainda ser incentivado mesmo sendo o isolado resistente no teste convencional, desde que seja realizado o teste com disco de alta potência, de 200 μg .

Cotrimoxazol

Na determinação da MIC da combinação de sulfametoxazol-trimetoprima ou cotrimoxazol, verificou-se que a maioria dos isolados de *E.coli* apresentou um

elevado nível de resistência a este antimicrobiano. Em somente 7 isolados dentre 129 o cotrimoxazol apresentou valores baixos de MIC, isto é, até 16/304 µg/mL (TMP/SMX). Em 95% dos isolados o cotrimoxazol teve MIC \geq 128/2432 µg/mL.

Os altos valores de MIC obtidos no presente estudo estão de acordo com o constatado por Burman *et al*, que também detectaram altos níveis de resistência para este fármaco nos EUA (BURMAN *et al*, 2003). Talan *et al*, observaram 65 % de falha clínica entre pacientes com *E. coli* resistentes que receberam cotrimoxazol para o tratamento de pielonefrite aguda não complicada (TALAN *et al*, 2000). Brown *et al*, entretanto mostraram que a taxa de cura clínica para pacientes com isolados de *E. coli* resistentes ao cotrimoxazol pode chegar a 55% (Brown *et al*, 2002).

Além da taxa de resistência ao cotrimoxazol ser elevada no mundo todo (GALES *et al*, 2002; GORDON & JONES, 2003; KAHLMETER, 2003), os isolados da comunidade onde foram realizados nossos testes, mostraram níveis de resistência muito elevados, já predizendo uma possível falha clínica em pacientes com isolados resistentes ao cotrimoxazol no teste convencional. Assim, não foram realizados os testes com discos de alta potência para este fármaco, permanecendo a indicação de não usar este antimicrobiano onde os testes convencionais mostrarem resistência.

Gentamicina

Para os testes com gentamicina, foram obtidos somente 22 isolados de *E. coli* resistentes a este antimicrobiano no período de seleção de amostras. Isto se deve à baixa prevalência de resistência da *E. coli* a este antimicrobiano, como mostraram estudos nos Estados Unidos, América Latina e Europa (BROWN *et al*, 2002; GALES *et al*, 2002; KAHLMETER & MENDAY, 2003).

O presente estudo constatou que em 63% dos isolados a gentamicina teve MIC menor que 128 µg/mL, e que estes isolados seriam consideradas susceptíveis a altos níveis de gentamicina, admitindo-se que a concentração na urina atinja 150 µg, embora a interpretação destes dados seja prejudicada pelo pequeno número de

isolados testados. Pelo reduzido número de isolados, não foram realizados testes com discos de alta potência para a gentamicina

Este trabalho demonstrou que o uso de discos de alta concentração pode ser útil para avaliar a susceptibilidade de isolados urinários, uma vez que, para agentes como ciprofloxacino e cefalotina foram obtidas boas correlações entre MIC e halo de inibição. Mesmo para ampicilina, os resultados permitiram a determinação de susceptibilidade. Isto tem importância em laboratórios clínicos onde, embora haja dificuldade na realização da MIC, testes de disco-difusão estão incorporados na rotina.

7. CONCLUSÕES

- a uma parcela significativa das amostras de *E. coli*, resistentes no teste convencional, foram consideradas susceptíveis a altos níveis de ampicilina (cerca de 50% das amostras), de cefalotina (78%) e de ciprofloxacino (cerca de 50%).
- a maioria das amostras de *E. coli* (95%) foram resistentes a altos níveis deste cotrimoxazol e, portanto, não foi realizado teste com disco de alta potência.
- embora cerca de 63% das amostras tenham sido susceptíveis a altos níveis de gentamicina, não foi realizado teste com discos de alta concentração devido ao baixo número de amostras.
- para a ampicilina, o disco de 500 µg apresentou melhor correlação com a MIC e um diâmetro de halo de 9 mm foi escolhido como ponto de corte para teste de susceptibilidade com este antimicrobiano.
- para a cefalotina, os discos de 100 e 200µg tiveram o mesmo coeficiente de correlação e o diâmetro de 17 mm foi escolhido como ponto de corte para testes com altos níveis de cefalotina (disco de 200 µg).
- para o ciprofloxacino, o disco de 200 µg mostrou melhor correlação e um diâmetro de halo de 21 mm foi escolhido para ponto de corte nos testes de susceptibilidade com este antimicrobiano.

8. REFERÊNCIAS

AHFS Drug information 2000. Bethesda: American Society of Hospital Pharmacists, 2000. 3546p.

Formatados: Marcadores e numeração

ALÓS, J. L.; SERRANO, M. G.; GÓMEZ-GARCÉS, J. L.; PERIANES, J. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p. 199-203, 2005.

BASKIN, H.; DOGAN, Y.; BAHAR, I. H.; YULUG, N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.19, p. 79 – 82, 2002.

Formatados: Marcadores e numeração

BARROS, E. Antimicrobianos: consulta rápida. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 2002. 428 p.

Formatados: Marcadores e numeração

BROWN, P; FREEMAN, A.; FOXMAN, B. Prevalence and predictors of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Michigan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 1061 – 1066, 2002.

Formatados: Marcadores e numeração

BURMAN, W.J.; BREESE, P.E.; MURRAY, B.E.; SINGH, K.V.; BATAL, H.A.; MACKENZIE, T.D.; OGLE, J.W.; WILSON, M. L.; REVES, R.R.; MEHLER, P.S. Conventional and molecular epidemiology of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among urinary *Escherichia coli* isolates. **The American Journal of Medicine**, v. 115, p. 358-364, 2003.

CHOMARAT, M. Resistance of bacteria in urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agent**,v. 16, p. 483 – 487, 2000.

Formatados: Marcadores e numeração

CLSI - **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI Document M100-S15**. Pennsylvania, 2005.

Formatados: Marcadores e numeração

CRAIG, W. A. Pharmacokinetic/ pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 1- 12, 1998.

Excluído: National Committee of Clinical and Laboratory Standards (NCCLS)

Excluído: .

Excluído: disk

Excluído: s

Excluído: NCCLS

Excluído: 3

Excluído: 3

Formatados: Marcadores e numeração

DAVID, R.D.; DEBLIEUX, P.M.C.; PRESS, R. Rational antibiotic treatment of outpatient genitourinary infections in a changing environment. **The American Journal of Medicine**, v. 118, p. 7- 13, 2005.

DIAS NETO, J.A.; MARTINS, A.C.P.; SILVA, L.D.M.; TIRABOSCHI, R.B.; DOMINGOS, A.L.A.; COLOGNA, A.J.; PASCHOALIN, E.L. TUCCI JR, S. **Community**

acquired urinary tract infection: etiology and bacterial susceptibility. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 33- 35, 2003a.

DIAS NETO, J.A.; SILVA, L.D.M.; MARTINS, A.C.P.; TIRABOSCHI, R.B.; DOMINGOS, A.L.A.; SU Aid, H.J.; TUCCI JR, S.; COLOGNA, A.J. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 36 – 38, 2003b.

FARRELL, D. J.; MORRISSEY, I.; DE DUBEIS, D.; ROBBINS, M.; FELMINGHAM, D. A UK Multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. **Journal of Infection**, v. 46, p. 94 – 100, 2003.

Formatados: Marcadores e numeração

FRIMODT-MOLLER, N. How predictive is PK/PD for antibacterial agents? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, p. 333 –339, 2002a.

Formatados: Marcadores e numeração

FRIMODT-MOLLER, N. Correlation between pharmacokinetic/ pharmacodynamic parameters and efficacy for antibiotics in the treatment of urinary tract infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, p. 546 – 553, 2002b.

Formatados: Marcadores e numeração

GALES, A. C.; SADER, H. S.; JONES, R. N, The SENTRY Participants Group(Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p. 289 – 299, 2002.

Formatados: Marcadores e numeração

GASPARI, R.; BOSKER, G. Urinary tract infection: Risk stratification, clinical evaluation, and evidence-based antibiotic therapy – year 2003 update. **Primary Care Consensus Report – American Health Consultants**, v. 15, p. 2 – 22, 2003.

Formatados: Marcadores e numeração

GOODMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª Ed. Rio de Janeiro : McGraw-Hill, 2003.1647p.

Formatados: Marcadores e numeração

GORDON, K. A.; JONES, R. N.; SENTRY Participant Groups (Europe, Latin america, North America). Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America: comparison report to Europe and Latin America. Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, p. 295 – 301, 2003.

Formatados: Marcadores e numeração

GRUDE, N.; TVETEN, Y.; KRISTIANSEN, B. E. Urinary tract infections in Norway: bacterial etiology and susceptibility. A retrospective study of clinical isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, p. 543 – 547, 2001.

Formatados: Marcadores e numeração

GUPTA, K.; HOOTON, T. M.; STAMM W. E. Increasing antimicrobial resistance and management of uncomplicated community- acquired urinary tract infections. **Annals of Internal Medicine**, v. 135, p. 41 – 50, 2001a.

Formatados: Marcadores e numeração

GUPTA, K.; SAHM, D.; MAYFIELD, D.; STAMM, W. E. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in women: a nationwide analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 89 – 94, 2001b.

Formatados: Marcadores e numeração

GUPTA, K. Addressing Antibiotic Resistance. **Dis Mon**, v. 49, p. 99 – 110, 2003.

KAHLMETER, G. An International survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 69 – 76, 2003.

Formatados: Marcadores e numeração

KAHLMETER, G.; MENDAY, P. Cross-resistance and associated resistance in 2478 *Escherichia coli* isolates from the Pan-European ECO.SENS Project surveying the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 128 –131, 2003.

Formatados: Marcadores e numeração

KAPOOR, H.; AGGARWAL, P. Resistance to quinolonas in pathogens causing urinary tract infections. **J. Commun. Dis.**, v. 29, p. 263 –267, 1997.

Formatados: Marcadores e numeração

KARLOWSKY, J. A.; KELLY, L. J.; THORNSBERRY, C.; JONES, M. E.; SAHM, D. F. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2540 – 2545, 2002.

Formatados: Marcadores e numeração

KARLOWSKY, J. A.; THORNSBERRY, C.; JONES, M. E.; SAHM, D. F. Susceptibility of antimicrobial-resistant urinary *Escherichia coli* isolates to fluoroquinolones and nitrofurantoin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p.183 –187, 2003.

Formatados: Marcadores e numeração

KAU, A.L.; HUNSTAD, D.A.; HULTGREN, S.J. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. **Current opinion in Microbiology**, v. 8, p. 54-59, 2005

KILLGORE, K.M.; MARCH, K.L.; GUGLIELMO, B.J. Risk factors for community-acquired ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* urinary tract infection. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, p. 1148- 1152, 2004.

KUNIN, C. M - Detection, prevention and management of urinary tract infections. Philadelphia : Lea & Febiger, 1987. 447p. 4ª ed.

Formatados: Marcadores e numeração

KUNIN, C. M. Urinary tract infections: detection, prevention and management. Baltimore: Williams & Wilkins,1997. 5ª Ed. 419p.

Formatados: Marcadores e numeração

LOPES, H.V.; TAVARES, W. Infecções do trato urinário não complicadas: diagnóstico. Sociedade Brasileira de Infectologia e Sociedade Brasileira de Urologia. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina 2004.a

LOPES, H.V.; TAVARES, W. Infecções do trato urinário não complicadas: tratamento. Sociedade Brasileira de Infectologia e Sociedade Brasileira de Urologia. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina 2004.b

Martindale. The complete drug reference. 32 ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. 2315p.

Formatados: Marcadores e numeração

MCCARTY, J. M.; RICHARD, G.; HUCK, W.; TUCKER, R.M.; TOSIELLO, R.L.; SHAN, M.; HEYD, A.; ECHOLS, R.M. A randomized trial of short-course

[ciprofloxacin, ofloxacin, or trimethoprim/sulfamethoxazole for the treatment of acute urinary tract infection in women. Ciprofloxacin Urinary Tract Infection Group. **The American Journal of Medicine**, v. 106, p. 292-299, 1999.](#)

MEHNERT-KAY, S. A. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. **American Family Physician**, v. 72, p. 451-456, 2005.

NABER, K. G. Treatment options for acute uncomplicated cystitis in adults. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 23 –27, 2000.

Formatados: Marcadores e numeração

NABER, K. G. Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 331-341, 2001.

Formatados: Marcadores e numeração

NCCLS - **National Committee of Clinical and Laboratory Standards**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, [sixth](#) edition. Approved Standard M7-A6. NCCLS. Pennsylvania, 2003a.

Formatados: Marcadores e numeração

Excluído: fourth

Excluído: 5

Excluído: 0

NCCLS - **National Committee of Clinical and Laboratory Standards**. [Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, Eighth edition. Approved standard M2-A8. NCCLS. Pennsylvania, 2003b.](#)

NICOLLE, L. E. Urinary tract infection: Traditional pharmacologic therapies. **Dis Mon**, v. 49, p. 111 – 128, 2003.

Formatados: Marcadores e numeração

OPLUSTIL, C. P.; NUNES, R.; MENDES, C. and the RESISTNET Group. Multicenter evaluation of resistance patterns of klebsiella pneumoniae, escherichiacoli, salmonella spp and shigella spp isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET surveillance program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 8-12, 2001.

RONALD, A. The Etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 14 – 19, 2002.

Formatados: Marcadores e numeração

[ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. Resistência bacteriana- Interpretando o antibiograma. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.](#)

RYBAK, M.J. Pharmacodynamics: relation to antimicrobial resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. 37 – 44, 2006.

Formatados: Marcadores e numeração

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A. L.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 200 – 214, 2001.

SAHM, D. F; THORNSBERRY, C.; MAYFIELD, D. C.; JONES, M. E.; KARLOWSKY, J. A. Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1402 – 1406, 2001.

Formatados: Marcadores e numeração

SCHOOLNIK, G. K. How *Escherichia coli* infects the urinary tract. **The New England Journal of Medicine**, v. 12, p. 804 – 805, 1989.

Formatados: Marcadores e numeração

SEFTON, A. M. The impact of resistance on the management of urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 489 – 491, 2000.

Formatados: Marcadores e numeração

SOMMERS, D. K. Pharmacological principles in the treatment of urinary tract infections. **SA Medical Journal**, v. 64, p. 123 – 126, 1983.

Formatados: Marcadores e numeração

TALAN, D.A.; STAMM, W.E.; HOOTON, T.M.; MORAN, G.J.; BURKE, T.; IRAVANI, A.; REUNING-SCHERER, J.; CHURCH, D.A. Comparison of ciprofloxacin (7 days) and trimethoprim-sulfamethoxazole (14 days) for acute uncomplicated pyelonephritis in women: a randomized trial. **JAMA**, v. 283, p. 1583-1590, 2000.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 792p.

Formatados: Marcadores e numeração

WARREN, J. W.; ABRUTYN, E.; HEBEL, J. R.; JOHNSON, J. R.; SCHAEFFER, A. J.; STAMM, W. E. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 745 – 758, 1999.

WELL, M.; NABER, K. G.; KINZIG-SCHIPPERS, M.; SÖRGEL, F. Urinary bactericidal activity and pharmacokinetics of enoxacin versus norfloxacin and ciprofloxacin in healthy volunteers after a single oral dose. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 10:, p.31 – 38, 1998.

Formatados: Marcadores e numeração

ZHANEL, G. G. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 468-475, 2006.

Excluído: Kau, A.L.; Hunstad, D.A.; Hultgren, S.J. Interaction

9. ANEXOS

ANEXO I. Coordenadas da curva ROC co de ampicilina 500µg

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): H500

Positive if Less Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
-1,00	,000	,000
3,00	,959	,414
6,50	,959	,429
7,50	,973	,457
8,50	1,000	,500
9,50	1,000	,614
10,50	1,000	,729
11,50	1,000	,771
12,50	1,000	,800
13,50	1,000	,829
14,50	1,000	,857
15,50	1,000	,871
16,50	1,000	,900
20,00	1,000	,914
24,00	1,000	,929
26,00	1,000	,943
28,00	1,000	,957
30,50	1,000	,971
32,50	1,000	,986
34,00	1,000	1,000

The test result variable(s): h500 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

a The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

ANEXO II. Coordenadas da curva ROC do disco de cefalotina 100 e 200µg

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s)	Positive if Less Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
H200	-1,0000	,000	,000
	8,0000	1,000	,000
	16,5000	1,000	,031
	18,0000	1,000	,046
	19,5000	1,000	,062
	20,5000	1,000	,077
	21,5000	1,000	,092
	22,5000	1,000	,185
	23,5000	1,000	,323
	24,5000	1,000	,508
	25,5000	1,000	,738
	26,5000	1,000	,908
28,0000	1,000	1,000	
H100	-1,0000	,000	,000
	6,0000	1,000	,000
	13,0000	1,000	,031
	15,0000	1,000	,046
	17,0000	1,000	,077
	18,5000	1,000	,092
	19,5000	1,000	,108
	20,5000	1,000	,262
	21,5000	1,000	,415
	22,5000	1,000	,646
	23,5000	1,000	,815
	24,5000	1,000	,923
26,0000	1,000	1,000	

a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

ANEXO III. Coordenadas da curva ROC do disco de ciprofloxacino 200µg

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): H200

Positive if Less Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
12,0000	,000	,000
13,5000	,067	,000
14,5000	,133	,000
15,5000	,167	,000
16,5000	,233	,000
17,5000	,500	,000
18,5000	,700	,000
19,5000	,900	,079
20,5000	1,000	,211
21,5000	1,000	,263
22,5000	1,000	,342
23,5000	1,000	,500
24,5000	1,000	,526
25,5000	1,000	,658
26,5000	1,000	,921
28,0000	1,000	,974
30,0000	1,000	1,000

The test result variable(s): H200 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

- a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.