

**SILVIO MARCIANO DA SILVA JUNIOR**

**Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas  
de crianças com infecção urinária.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT  
para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta de Oliveira Domingos

Versão corrigida. Versão original eletrônica encontra-se  
disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca  
digital de teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo  
2012

## RESUMO

SILVA JR, S. M. **Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de crianças com infecção urinária.**f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Infecção do Trato Urinário (ITU) é o segundo tipo de infecção bacteriana mais comum em crianças. Nesse estudo amostras de urina de 6012 pacientes pediátricos foram analisadas, a prevalência de ITU foi determinada, os uropatógenos foram identificados e o perfil antimicrobiano dos mesmos foi determinado. Os resultados mostraram que a prevalência de ITU varia de acordo com o sexo e a idade do paciente. Bactérias Gram-negativas foram responsáveis por 89% de todos os casos de ITU enquanto bactérias Gram-positivas e *Candida* spp. foram respectivamente responsáveis por 4,8 % e 6,37 %. *Escherichia coli* foi a espécie mais encontrada em todas as faixas etárias estudadas de ambos os sexos. Resultados obtidos com a caracterização de 90 isolados de *E. coli*, mostraram que todas as amostras foram positivas para os marcadores *fimA* e *fimH*, 53% para *pap*, 32% para *sfa*, 10% para o marcador genético da toxina pic e 29 % foram capazes de produzir hemolisina- $\alpha$ . Esses isolados se distribuíram entre os grupos filogenéticos da seguinte maneira: B2 42%, D 25%, A 21% e B1 11%. Dessas amostras 19 % não foram tipáveis (ONT), 15,56 % pertenceram ao sorogrupo O2 e 12,22 % aos sorogrupos O6 e OR. A maioria dos isolados de *E. coli* (78,89%) aderiu às células epiteliais Vero. A capacidade de formação de biofilme foi alta em ambos os materiais (poliestireno e PVC), sendo que no poliestireno a formação de biofilme é maior.

**Palavras-chaves:** *Escherichia coli* uropatogênica, Infecção do trato urinário, UPEC, Crianças.

## ABSTRACT

SILVA JR, S. M. **Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de crianças com infecção urinária.** f. MASTERS THESIS (BIOTECHNOLOGY) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Urinary Tract Infection (UTI) is the second most common type of bacterial infection in children. In this study, 6012 urine samples from pediatric patients were analyzed, the prevalence of UTI was determined, the uropathogens were identified and their antimicrobial profile was determined. The results have shown that the prevalence of UTI varies according to the sex and age of the patient. Gram negative bacteria were responsible for 89 % of all cases of UTI whereas Gram-positive and *Candida* spp. were respectively responsible for 4.8 % and 6.37 %. *Escherichia coli* was the most encountered bacterial species in all the age groups of both sexes. Results obtained with the characterization of 90 isolates of *E. coli* showed that all of them were positive for *fimA* and *fimH*, 53 % were positive for *pap*, 32 % were positive for *sfa*, 10 % were positive for the genetic marker of *pic* and 29 % were able to produce hemolysin- $\alpha$ . These isolates were distributed between the phylogenetic groups as follows: B2 42 %, D 25 %, A 21 % and B1 11 %. Nineteen percent of these samples were untypeable (ONT), 15.56 % belonged to O2 serogroup and 12.22 % belonged to the O6 and OR serogroups. Most *E. coli* isolates (78.89%) were able to adhere to Vero epithelial cells. The capability of biofilm formation was high in both materials (polystyrene and PVC), being that on polystyrene biofilm formation is higher.

**Keywords:** Uropathogenic *Escherichia coli*, Urinary tract infections, UPEC, Children.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Infecção do Trato Urinário (ITU)

Infecção do trato urinário (ITU) é definida pela colonização de microrganismos em qualquer órgão do trato urinário, da uretra ao rim (MARANGONI; MOREIRA, 1994). Estima-se que esse tipo de infecção afete cerca de 150 milhões de pessoas por ano em âmbito global, gerando um custo com tratamento de saúde maior que seis bilhões de dólares (STAMM; NORRBY, 2001).

Apesar da ITU ser um problema de saúde de ordem pública, econômica e social elevada, a incidência dessa infecção no Brasil é difícil de ser estimada, por não se enquadrar no grupo de notificação obrigatória do Serviço de Saúde Pública (FOXMAN, 2002; BRASIL, Ministério da Saúde, 2006). Todavia, dados levantados através de estudos feitos sobre a prevalência dessa infecção na população indicaram que a ITU é a infecção bacteriana de maior ocorrência na clínica médica e afeta principalmente mulheres. Somente nos EUA cerca de 60% das mulheres contraem ITU pelo menos uma vez na vida, sendo que, 11% apresentam ITU anualmente (FOXMAN et al., 2000; FOXMAN, 2002). Ainda nos EUA são realizadas oito milhões de visitas anuais ao consultório médico referentes apenas à ITU crônica, o que faz dessa infecção um problema clínico economicamente significativo (BOWER et al., 2005). No Brasil, aproximadamente 50 a 70% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de ITU durante a vida e dentre estas, 20 a 30% tem episódios recorrentes (GUPTA et al., 2001). A ITU é após a respiratória, a infecção que mais afeta crianças. Ela ocorre principalmente nos primeiros anos de vida em ambos os sexos (de 0 à 4 anos), porém tem um grande aumento durante a adolescência no sexo feminino (GUIDONI; TOPOROVSKI, 2001; WINBERG et al., 1974). Apesar da taxa de mortalidade por ITU ser próxima a zero, as conseqüências deste tipo de infecção em longo prazo podem ser graves como: surgimento de cicatrizes renais, hipertensão arterial, deterioração da função renal e até mesmo complicações na gestação. Além disso, a combinação de infecções recorrentes ou pielonefrite com má-formação do trato urinário ou disfunção miccional aumentam a chance de um dano renal (KOCH; ZUCCOLOTTO, 2001; RIYUZO et al., 2007).

## 1.2 Classificação clínica da ITU

A ITU pode ser classificada como complicada e sem complicação (FOXMAN, 2002; HEILBERG; SCHOR, 2003). As ITUs complicadas ocorrem em pacientes com anormalidades anatomofuncionais, obstruções do trato urinário, problemas metabólicos, pacientes transplantados, bem como quando estas foram adquiridas no ambiente hospitalar ou devido a necessidade do uso de instrumentos médicos como cateteres. As ITUs caracterizadas como sem complicações são aquelas adquiridas fora do ambiente hospitalar por pacientes com estrutura e função normal do trato urinário (ARSLAN et al.;2005; HEILBERG; SCHOR, 2003;HOOTON; STAMM, 1997). Todavia, em ambos os tipos de ITU, o paciente tem grande chance de ter uma infecção recorrente poucas semanas ou meses após a ITU inicial. Isso ocorre principalmente em mulheres, sendo que muitas delas apresentam ITU recorrente e problemas adicionais como cicatrizes renais e aumento do risco de desenvolver câncer de bexiga (FOXMAN, 2002; KANTOR et al., 1984; YAMAMOTO et al., 1995).

As infecções do trato urinário são classificadas como: inferior (cistite – infecção na bexiga) e superior (pielonefrite – infecção do rim) (ANDERSON et al., 2004). Os sintomas da cistite são relativamente moderados, incluindo necessidade freqüente ou urgente de urinar e dor no baixo ventre. A pielonefrite tem sintomas mais graves como: dor na parte inferior das costas, febre, náusea e vômitos. Além disso, a pielonefrite pode gerar complicações como bacteremias (em cerca de 30% dos casos) podendo evoluir para sepse (ANDERSON et al., 2004; HEILBERG; SCHOR, 2003; MCBEAN; RAJAMANI, 2001; SIEGMAN-IGRA et al., 2002).

## 1.3 Agentes etiológicos

Várias bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* ssp., *Citrobacter* ssp., *Enterobacter* ssp., *Acinetobacter* ssp., *Proteus* ssp., *Pseudomonas* ssp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* podem ser responsáveis por infecções do trato urinário. Algumas leveduras, principalmente *Candida albicans*, também podem causar infecção urinária (FALCÃO et al., 2000; HEILBERG; SCHOR, 2003).

Com exceção de *E. coli*, a incidência na população de outros agentes etiológicos responsáveis por infecção urinária é baixa. Por exemplo, estudos realizados no Brasil em Brasília, Goiânia, Ribeirão Preto e

São Paulo mostraram a seguinte prevalência: 2 a 9% *Proteus ssp.*, 3% *Pseudomonas ssp.*; 1 a 3 % *Enterobacter ssp.*, 1 a 6% *Klebsiella ssp.*, 1 a 20% *Staphylococcus ssp.*, e 1 a 5% leveduras (FALCÃO et al., 2000; NETO et al., 2003; PIRES et al., 2007; POLETTO; REIS, 2005). Todavia, na Turquia foi demonstrado que a prevalência desses agentes etiológicos é menor do que 2% (ARSLAN et al., 2005; YÜKSEL et al., 2006). No entanto, no caso de ITU nosocomiais, *P. aeruginosa* é em âmbito global o principal agente etiológico. *E. coli*, por sua vez, é a bactéria mais comumente isolada em ITU comunitária, sendo que dependendo da população estudada sua prevalência varia entre 55 a 90% (ANDERSON et al., 2004; ARSLAN et al., 2005; FALCÃO et al., 2000; FOXMAN, 2002; KANTOR et al., 1984; MCBEAN; RAJAMANI 2001; NETO et al., 2003; PIRES et al., 2007; POLETTO; REIS, 2005; SIEGMAN-IGRA et al., 2002; YAMAMOTO et al., 1995; YÜKSEL et al., 2006). Por exemplo, na Turquia, *E. coli* é o agente causador de 90% das ITU sem complicações e de 78% das ITU com complicações (ARSLAN et al., 2005). Já nos EUA, *E. coli* é isolada entre 70 e 95% dos casos de ITU comunitária e em 50% dos casos de ITU nosocomial (FOXMAN, 2002; HOOTON; STAMM, 1997; SADLER et al., 1989; SVANBORG; GODALY, 1997). No Brasil, estudos realizados em pacientes ambulatoriais em Goiânia no ano de 2003, mostraram que a prevalência de *E. coli* nesses pacientes foi de 67,9% (POLLETO; REIS, 2005). No Hospital Universitário de Brasília no período de 2001 a 2005, *E. coli* foi encontrada em 62,4% das ITU (PIRES et al., 2007). Em 2003, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 58,4% dos isolados de ITU eram *E. coli* (NETO et al., 2003).

### 1.3.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo que pode ser encontrado no meio ambiente e na microbiota intestinal normal do homem e de outros animais, onde mantém uma relação comensal de benefício mútuo com o hospedeiro. Porém, mesmo *E. coli* comensais podem se tornar patogênicas, quando houver uma quebra no equilíbrio da relação com o hospedeiro (p. e. pacientes debilitados ou lesões teciduais) ou quando a bactéria estiver fora do trato gastrointestinal, ou seja, em outras partes do organismo. A transmissão horizontal de genes de virulência provenientes de outras bactérias patogênicas também pode ser responsável pela transformação de *E. coli* comensais em cepas patogênicas (KAPER et al., 2004).

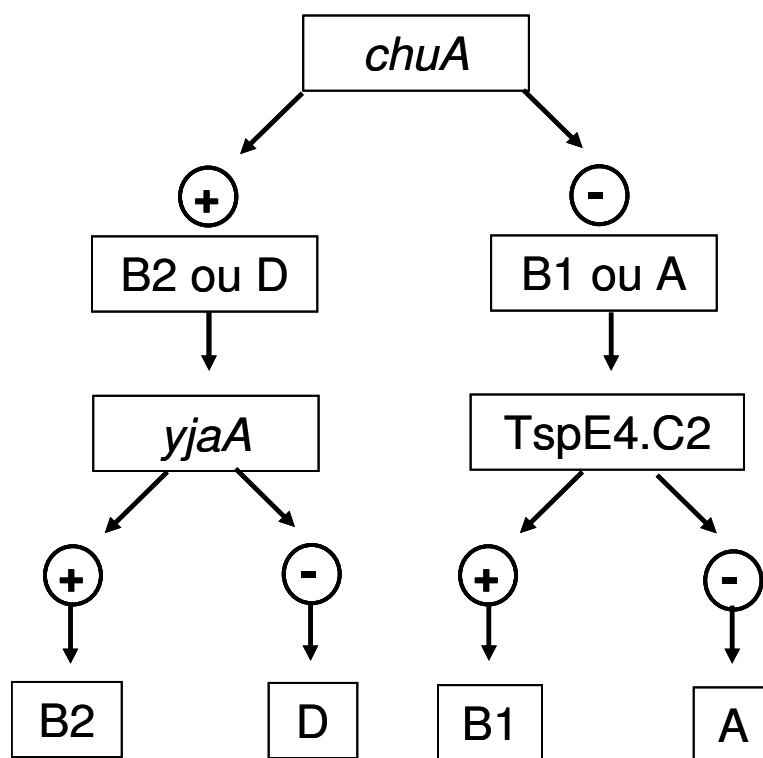
Além das *E. coli* comensais, existem também *E. coli* patogênicas que são capazes de causar infecções em indivíduos sadios por possuírem uma combinação muito bem sucedida de fatores de

virulência, adquiridos durante a evolução que as transformaram em “PATÓTIPOS” específicos de *E. coli* (KAPER et al., 2004).

*Escherichia coli* patogênicas podem ser classificadas em *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000). As ExPEC podem ser subdivididas nos seguintes grupos: *E. coli* responsáveis por infecção urinária, denominadas de UPEC (*E. coli* uropatogênica), as que causam meningite, denominadas de MNEC (*E. coli* associada à meningite) e as causadoras de sepse, denominadas de SEPEC (*E. coli* associada à sepse) (KAPER et al., 2004). Entre as *E. coli* intestinais que causam diarreia existem seis categorias bem definidas que são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004). Também podemos destacar as *E. coli* patogênica aviária (APEC) causadora de diversas doenças extra-intestinais em aves (GROSS, 1994), pois alguns estudos demonstram APECs são muito semelhantes as amostras extra-intestinais, principalmente as UPECs (EWERS et al., 2007).

Análises filogenéticas demonstraram que as *E. coli* pertencem a quatro grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D). Estes grupos foram definidos com base em árvores filogenéticas geradas através das técnicas de MLEE (“multilocus enzyme electrophoresis”) e ribotipagem (HERZER et al., 1990; SELANDER et al., 1986). Com base nestes resultados, Clermont et al. (2000) desenvolveram um método mais simples, baseado em PCR (Triplex PCR), para identificação rápida dos grupos filogenéticos de *E. coli*. Esse método é baseado na presença ou ausência dos seguintes genes: *chuA* (responsável pelo transporte do grupo heme no sistema de aquisição de ferro de EHEC O157:H7), *yjaA* (envolvido na resposta da *E. coli* ao estresse causado por peróxido de hidrogênio, cádmio e ácidos) e um fragmento de DNA denominado TspE4.C2. O grupo A é caracterizado pela ausência do gene *chuA* e do fragmento TspE4.C2. O grupo B1 é caracterizado pela ausência do gene *chuA* e pela presença do fragmento TSE4.C2. O grupo B2 é caracterizado pela presença dos genes *chuA* e *yjaA*. O grupo D por sua vez é caracterizado pela presença do gene *chuA* e ausência de *yjaA* (figura 1).

Figura 1- Grupos filogenéticos de *E. coli*: B2 [*chuA* (+) e *yjaA* (+)], D [*chuA* (+) e *yjaA* (-)], B1 [*chuA* (-) e TSP E4.C2 (+)] e A [*chuA* (-) e TSP E4.C2 (-)].



Fonte: (CLERMONT et al., 2002).

As *E. coli* se distribuem entre os 4 principais grupos filogenéticos da seguinte maneira: as comensais predominam no grupo A aparecendo em menor número no grupo B1. As *E. coli* patogênicas extra-intestinais aparecem em sua maioria nos grupos B2 e D, e as *E. coli* patogênicas intestinais aparecem bem distribuídas entre todos os 4 grandes grupos (BINGEN et al., 1998; PUPO et al., 1997).

Foi observado que a distribuição dos grupos filogenéticos de *E. coli* na microbiota intestinal varia geograficamente de acordo com a população analisada e fatores sócio-econômicos como hábitos alimentares e higiene (TENAILLON et al., 2010). Mesmo assim, foi constatado que a maior parte das *E. coli* uropatogênicas se encontra no grupo filogenético B2 onde predominam as bactérias extra-intestinais com maior número de fatores de virulência (BUKH et al., 2009; CLERMONT et al., 2000; PICARD et al., 1999).



### 1.3.2 *Escherichia coli* Uropatogênica

A grande variabilidade genética encontrada entre as cepas de UPEC não permite que as mesmas sejam agrupadas em categorias distintas como acontece no caso de *E. coli* diarreioogênicas (BOWER et al., 2005; LLOYD et al., 2007). Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar a origem dessa diversidade. Uma delas preconiza que bactérias patogênicas podem se transformar em bactérias uropatogênicas através da transmissão horizontal de genes de virulência que possibilitam que as mesmas infectem e sobrevivam no trato urinário (ABE et al., 2008; EWERS et al., 2007; KAPER et al., 2004; WILES et al., 2008).

Através dos fatores de virulência, algumas cepas de UPEC podem invadir as células epiteliais do hospedeiro e produzir um biofilme intracelular que confere proteção em relação ao ataque do sistema imune e tratamento com antibióticos por longos períodos. Essa propriedade das UPECs pode explicar a natureza enigmática da infecção crônica e recorrente da ITU (ANDERSON et al., 2004; BOWER et al., 2005; KAPER et al., 2004).

Os fatores de virulência mais comumente associados às UPEC são: adesinas específicas, como fimbria P (Pap), fimbria tipo 1 (associada com adesina FimH), fimbria S, outras adesinas não fimbriais (como Afa/Dr, F1C, M) e toxinas secretadas como: Vat, Sat, Pic, CNF-1, hemolisina, formação de cápsula de polissacarídeos para imunoevasão, e recombinases de mudança de fase (JOHNSON, 1991; KAPER et al., 2004; RUSSO; JOHNSON, 2000).

A fimbria Tipo 1 é um importante fator de virulência encontrado em UPEC e em outras *Enterobacteriaceae*. Ela possui afinidade a oligossacarídeos do tipo manose (KROGFELT et al., 1990) e em UPEC é essencial para a adesão ao epitélio do trato urinário (CHEN et al., 2009). Essa fimbria é constituída por um filamento protéico de aproximadamente 5 nm de espessura e 1 a 2µm de comprimento, codificado pelo *operonfim*, composto pelos genes: *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG*, *fimH* e *fimL* (MOL; OUDEGA, 1996), responsáveis pela expressão e montagem do filamento via chaperonina-usher. (HULTGREN; NORMARK, 1991). A proteína codificada pelo gene *fimA* corresponde a maior subunidade fimbrial, enquanto o gene *fimH* codifica a menor subunidade da fimbria, presente na extremidade da estrutura fimbrial e responsável pela sua aderência (CHEN et al., 2009).

A Hemolisina-α também é considerada um dos principais fatores de virulência encontrado em UPEC e também responsável por evasão da resposta imune. Essa toxina é membro da família de toxinas que se repetem (repeats-in-toxin – RTX-family) sendo inicialmente isolada em UPEC J96 (KAPER, et al.,

2004; WELCH, 1991). Ela é dependente de cálcio, formadora de poro e uma das principais toxinas responsáveis pela obtenção de ferro para a bactéria durante o processo infeccioso.

A diversidade das UPECs é tão elevada que este grupo de bactérias pode carregar genes de virulência específicos de *E. coli* diarréiogênicas como, por exemplo o gene que codifica a proteína Pic (“protein involved in intestinal colonization”). A proteína Pic pertencente ao grupo das SPATES (Serine Protease Autotransporters) (DAUTIN, 2010; HENDERSON et al., 1999).

Apesar da grande diversidade de cepas encontradas em UPEC, alguns métodos tradicionais como a determinação de sorogrupos (antígenos somáticos O) são utilizados para a classificação das mesmas. Atualmente 181 sorogrupos de *E. coli* já foram descritos, dentre estes, 10 sorogrupos (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 e O75) são os mais encontrados em infecções do trato urinário (JOHNSON, 1991; ORSKOV et al., 1982; BIDEF et al., 2007; LLOYD et al., 2007).

#### **1.4 Resistência de uropatógenos a agentes antimicrobianos.**

O tratamento utilizado em casos de infecção urinária é feito através do uso de diferentes tipos de agentes antimicrobianos. Eles podem ser administrados pela via oral ou parenteral. Pela via oral os antimicrobianos mais utilizados são os seguintes: sulfametoxazol, trimetoprim, amoxicilina, ácido nalidíxico, ácido pipemídico, cefalexina, ciprofloxacina, norfloxacina ou nitrofurantoína (HEILBERG; SCHOR, 2003).

Os agentes antimicrobianos acima citados pertencem a diferentes classes que são categorizadas de acordo com o modo de ação, estrutura química e atividade do agente antimicrobiano. De acordo com Trabulsi e Alterthum (2004) os agentes antimicrobianos são classificados da seguinte maneira:

- a) aminoglicosídeos: (amicacina, gentamicina);
- b)  $\beta$ -Lactâmicos: penicilinas (ampicilina), penicilina + inibidor de  $\beta$ -lactamase (piperacilina/tazobactam), cefalosporinas de primeira (cefalexina), segunda (cefoxitina), terceira geração (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona), Monobactâmicos (aztreonam), Carbapenêmicos (imipenem, meropenem);
- c) Derivados imidazólicos (nitrofurantoína);
- d) quinolonas (ácido nalidíxico); Fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina);
- e) anfenicóis (cloranfenicol);
- f) sulfonamidas (sulfametoxazol).

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas que se ligam a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo assim a leitura correta do RNA mensageiro e conseqüentemente a síntese de proteínas. A resistência de algumas bactérias a aminoglicosídeos é devida à existência de enzimas bacterianas que inativam esses antibióticos. Os genes que codificam essas enzimas são transmitidos de bactérias resistentes para bactérias ainda susceptíveis através de recombinação, troca de plasmídeos ou transposons de DNA.

Todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos) atuam interferindo na síntese de peptidoglicanos inibindo a transpeptidação que ancora o peptidoglicano em forma estrutural rígida em volta da bactéria. Sendo o interior da célula bacteriana hiperosmótico, sem uma parede rígida há afluxo de água do exterior e a bactéria é rompida (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

As cefalosporinas são agrupadas em "gerações" por suas características antimicrobianas. As primeiras cefalosporinas foram agrupadas na "primeira geração" enquanto mais adiante, cefalosporinas de espectro de ação mais amplo frente a bactérias gram-negativas, foram classificadas como cefalosporinas de segunda geração. Cada nova geração de cefalosporinas tem mais potência frente a bactérias gram-negativas e características antimicrobianas perceptivelmente maiores que a geração precedente. O mecanismo de resistência bacteriana às penicilinas e cefalosporinas, baseia-se na produção de enzimas bacterianas denominadas  $\beta$ -lactamases que degradam esses antibióticos antes de sua atuação. Essa resistência em algumas cepas bacterianas é transferida através da disseminação de plasmídeos que codificam o gene da proteína beta-lactamase. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Os carbapenêmicos também são um grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com a diferença de que o átomo de enxofre no anel tiazolidínico da molécula de penicilina é substituído por um átomo de carbono (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A maior parte dos derivados imidazólicos são agentes fungicidas e atuam interferindo no metabolismo do lanosterol, levando a uma diminuição do ergosterol e acúmulo de esterol que culmina na alteração da permeabilidade das membranas dos fungos. Porém alguns derivados imidazólicos como a nitrofurantoína são agentes antibacterianos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

As sulfonamidas agem inibindo a síntese de DNA na etapa da biossíntese do ácido fólico e as quinolonas atuam inibindo a síntese de DNA bloqueando a ação das girases (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Tem sido observado nos últimos anos um crescente aumento da resistência de uropatógenos a diversas classes de antimicrobianos. Em diversas cidades brasileiras bactérias isoladas de amostras de urina de pacientes adultos com quadro de infecção urinária demonstraram uma alta resistência às sulfonamidas. (POLETTI; REIS, 2005; PIRES, et al., 2007; EPARIS, et al., 2006). Ainda no Brasil e em alguns países como a Grécia e a Turquia foi verificado um aumento na resistência às quinolonas e fluoroquinolonas (ENA et al., 1995; ZERVOS et al., 2003; GOETTSCHE et al., 2000; KARLOWSKY et al., 2002). Além disso, um estudo realizado em adultos nos Estados Unidos mostrou que os uropatógenos analisados foram em geral resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados, sendo que em pacientes idosos, eles tenderam a ser multi-resistentes (KARLOWSKY et al., 2001). A atual situação de resistência bacteriana a agentes antimicrobianos em grande parte é devida ao uso indiscriminado de antibióticos pela população sem o aconselhamento médico (KARLOWSKY et al., 2001). Como medida para prevenir a emergência de patógenos multi resistentes mais adaptados a colonização do trato urinário, em 2010 o governo brasileiro obrigou a apresentação de receita médica para a aquisição de antibióticos.

O surgimento de patógenos emergentes juntamente com o crescimento da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos são fatores que podem complicar significativamente o cuidado com os pacientes ao aumentarem o tempo de internação e a necessidade de esquemas terapêuticos mais caros e complexos. Essa situação é ainda mais grave na população infantil, onde as dificuldades de tratamento e evolução da doença tornam-se mais sérias. Por essa razão, estudos que determinem a prevalência, a caracterização e o perfil antimicrobiano de uropatógenos, tanto a nível regional quanto institucional são fundamentais para a otimização de práticas terapêuticas, principalmente em casos de urgência onde o tratamento deva ser iniciado de imediato sem o auxílio da urocultura ou do antibiograma que levam cerca de 48 horas para serem realizados.

## 5 CONCLUSÕES

A prevalência de ITU nas crianças de 0 a 16 anos de idade admitidas no Hospital Infantil Darcy Vargas entre setembro de 2008 a agosto 2009 foi de 16,98% sendo 10,23% pacientes masculinos e 5,75% pacientes femininos. A prevalência de ITU variou com a idade e o sexo do pacientes, sendo nos primeiros anos de vida maior em pacientes do sexo masculino.

O principal agente etiológico responsável por ITU foi *E. coli*, para ambos os sexos e as faixas etárias estudadas, seguida por *Proteus* spp. que foi predominante no sexo masculino.

Verificamos que a probabilidade de um paciente do sexo feminino ser infectado por *E. coli* ou *Staphylococcus* spp. foi respectivamente 3,04 e 6,95 vezes maior que um paciente do sexo masculino e a probabilidade de um paciente do sexo masculino estar infectado por *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. foi respectivamente 2,72 e 4,15 maior que um paciente do sexo feminino

Cistite foi o quadro clínico predominante dos pacientes cujas amostras de *E. coli* foram analisadas.

O grupo filogenético predominante nas amostras de *E. coli* analisadas foi o B2.

Os resultados mostraram que independente da fimbria do tipo 1, essencial para o desenvolvimento de ITU, a grande variação de marcadores de virulência encontrada em relação a cada quadro clínico analisado, indica que a adesão e a colonização de *E. coli* no trato urinário para o estabelecimento da infecção é multifatorial.

As amostras bacterianas isoladas de pacientes com quadro clínico de pielonefrites demonstram maior resistência e menor virulência que as amostras isoladas de casos de cistites.

A maior parte das amostras pertenceram a sorogrupos diferentes dos 10 principais isolados em UPEC, e grande parte não foram possíveis de serem tipados, provavelmente pertencem a sorogrupos desconhecidos.

A maior parte das amostras tem alguma capacidade de adesão as células Vero.

As amostras formam menos biofilme no PVC que no poliestireno, indicando que os cateteres de PVC devem ser mais seguros, que os de poliestireno.

## REFERÊNCIAS\*

- ABDALLAH, K.S.; et al. Epidemiologic Investigation of Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) based on PCR phylogenetic group and *fimH* single nucleotide polymorphism (SNPs) in China. **Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.**, v. 2, p. 339-353, 2011.
- ABE, C.M.; et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 397–406, 2008.
- ANDERSON, G.G.; et al. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. **Microbes Infect.**, v.6, p. 1094-1101, 2004.
- ARSLAN, H.; et al. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community – acquired urinary tract infections in Turkey. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 56, p. 914-918, 2005.
- BERCION, R.; et al. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae uropathogens in Bangui, Central African Republic. **J Infect Dev. Countries**, v. 3, 187-190, 2009.
- BERGER, H.; et al. Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.152, p. 1241-1247, 1982.
- BEUTIN, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immunol.** v. 180, p. 167–182, 1991.
- BIDET, P.; et al. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. **J. Infect. Dis.** v. 196, p. 297–303, 2007.
- BINGEN, E.; et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 642-650, 1998.
- BOWER J.M.; et al. Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. **Traffic.**, v. 6, p. 18-31, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Portaria no- 5, de 21 de fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, definem doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 38, p. 34, 21 fev. 2006. Seção 1.

---

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR: 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUKH, A.S.; et al. *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 64, p. 163–1683, 2009.

CAMPOS, T.; et al. Infecção urinária na criança. **Acte Urol.**, v. 23, p. 19-23, 2006.

CHANG, S.L.; SHORTLIFFE, L.D. Pediatric Urinary Tract Infections. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 53, p. 379-400, 2006.

CHEN, S.L.; et al. Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 12879-12884, 2009.

CHERIFI, A.; et al. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from Human septicemia. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 70, p. 279-283, 1990.

CLERMONT, O.; et al. Rapid and simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

CLSI. **Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline**: Third Edition. CLSI document M39-A3, 2009.

CULLER, H. F. **Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DAUTIN, N. Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and Function. **Toxins**, v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DIAS, R.C.S.; et al. Clonal Composition of *Escherichia coli* Causing Community-Acquired Urinary Tract Infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Microb. Drug Resist.**, v. 15, p. 303-308, 2009.

DUDLEY, E.G.; et al. An Inc11 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 74, , p. 2102-2114, 2006.

EMAMGHORASHI, F.; et al. The Prevalence of O Serogroups of *Escherichia coli* Strains Causing Acute Urinary Tract Infection in Children in Iran. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, v. 22, p. 597-601, 2011.

ENA, J.; et al. Risk factors for acquisition of urinary tract infections caused by ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. **J. Urol.**, v.153, p. 117–20, 1995.

EPARIS, C.M.; et al. Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na Cidade do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, p. 573-576, 2006.

EWERS, C., et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Int. J. Med. Microbiol.** v. 297, p. 163–176, 2007.

EWING, W.H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. New York:Elsevier:, 1986.

FALCÃO, M. C.; et al. Urinary Tract Infection in Full-Term Newborn Infants: Risk Factor Analysis. **Rev. Hosp. Clín. São Paulo**, v.55, p. 9-16, 2000.

FOXMAN B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Am. J. Med.**, v. 113, p. 5S–13S, 2002.

FOXMAN, B.; et al.. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. **Ann. Epidemiol.**, v.10, p. 509–515, 2000.

FREEDMAN, A.L. Urologic diseases in North America Project: trends in resource utilization for urinary tract infections in children. **J. Urol.**, v. 173, p. 949–954, 2005.

GIBREEL, T.M.; et al. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. **J. Antimicrob. Chemother.**, 2011.

GOETTSCHE, W.; et al. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in The Netherlands. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, p. 223–228, 2000.

GROSS, W.B.; Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: GYLES C.L. (Ed.), **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford, UK: CAB International, 1994, p.237-259.

GUIDONI, E.B.M.; TOPOROVSKI, J. Infecção urinária na adolescência. **J. Pediatr.**, v. 77, p. 165-169, 2001.

GÜNDOĞDU, A.; et al. Antimicrobial resistance and distribution of *sul* genes and integron-associated *intl* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. **J. Med. Microb.**, v. 60, p. 1633-1642, 2011.

GUPTA, K.; et al. Patient-Initiated Treatment of Uncomplicated Recurrent Urinary Tract Infections in Young Women. **Ann. Internal Med.**, v. 135, p. 9-16, 2001.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – ITU. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, p. 109-116 2003.

HENDERSON, I. R.; et al. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, p. 5587–5596, 1999.

HERNANDES, R. T.; et al. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the Bundle-Forming Pilus. **J. Clin. Microb.**, v. 44, p.4214-17, 2006.

HERZER, P. J.; et al. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

HOOTON, T. M.; STAMM, W.E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.11, p. 551-581, 1987.

HÖRNER, R.; et al. Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria. **RBAC**. v. 38, p.147-150, 2006.



HOUDOUIN, V.; et al. Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 748-751, 2006.

HULTGREN, S.J.; NORMARK, S. Biogenesis of the bacterial pilus. **Curr. Opin Genet. Devel.**, v. 1, n. 3, p. 313-318, 1991.

JADHAV, S.; et al. Virulence Characteristics and Genetic Affinities of Multiple Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* from a Semi Urban Locality in India. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 80-128, 1991.

JOHNSON, J. R.; et al. Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistance and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 15, p. 1739-1744, 2004

KANTOR, A. F.; et al. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. **Am. J. Epidemiol.**, v. 119, p. 510-515, 1984.

KAPER, J. B.; et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microb.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARLOWSKY, J. A.; et al. Prevalence of antimicrobial resistance among urinary tract pathogens isolated from female outpatients across the US in 1999. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.18, p. 121-127, 2001.

KARLOWSKY, J. A.; et al. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 2540-2545, 2002.

KASHEF, N.; et al. Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran, Iran. **J. Infect. Dev. Ctries**, v. 4, p. 202-206, 2010.

KOCH, V. E.; ZUCCOLOTTO, S. M. C. Infecção do trato urinário. Em Busca das Evidências. **J. Pediatr.** v.79, p. S97-S106, 2001.

KROGFELT, K. A.; et al. Direct evidence that the FimH protein is the mannose specific adhesin of *Escherichia coli* type 1fimbriae. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 1995-1998, 1990.

KWAN, C. W.; ONYETT, H. Community-acquired urinary tract pathogens and their resistance patterns in hospitalized children in southeastern Ontario between 2002 and 2006. **Paediatr. Child. Health**, v. 13, p. 759-762, 2008.

LLOYD, A.L.; et al. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 3532-3546, 2007.

LOURENÇO, D.M.L.; et al.. Prevalence of urinary tract infections in children of Hospital Ana Costa. **Rev. Méd. Ana Costa**. v. 10., p. 23-25, 2005.

MARANGONI, D.V.; MOREIRA, B.M. **Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica.** Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. 1994.

MASHOUF, R.Y.; et al. Urinary tract infections: bacteriology and antibiotic resistance patterns. **Ind. Ped.**, v. 15, p. 1-4, 2009.

MCBEAN, M.; RAJAMANI, S. Increasing rates of hospitalization due to septicemia in the US elderly population, 1986–97. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 596–603, 2001.

MILKMAN, R. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. **Science**, v. 182, p. 1024-1026, 1973.

MLADIN, C.; et al. Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with neurogenic bladder. **Rom. Biotechnol. Letters**, v. 14, p. 4900-4905, 2009.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microb. Rev.**, v. 19, p. 25-52, 1996.

MOLINA-LÓPEZ, J.; et al. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 5, p. 840-849, 2011.

MULLER, D.; et al. Relationship between plasmid and chromosomal hemolysin determinants of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 153, p. 846-851, 1983.

NETO, J.A.D.; et al. Community acquired urinary tract infection: etiology and bacterial susceptibility. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, p. 33-36, 2003.

NORINDER, B.S.; et al. Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? **Microb. Pathog.**, v. 52, p. 10-16, 2012.

NOWROUZIAN, F. et al. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover and virulence gene carriage. **Pediatr. Res.**, v. 54, p. 8-14, 2003.

OLIVEIRA, F.A.; et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Gen. Mol. Res.** 2011.

ORSKOV, I.; et al. O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. **Scan. J. Infect. Dis.**, v. 33, p. 18-25, 1982.

PICARD, B.; et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** v. 67, p. 546–553, 1999.

PIRES, M. C. S.; et al. Prevalência e suscetibilidade bacterianas das infecções do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Rev. Soc. Med. Trop.**, v. 40, p. 643-647, 2007.

POLETTO, K.Q.; REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 416-420, 2005.

- PUPO, G.M.; et al. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2685-2692, 1997.
- QURESHI, A.M. Organisms causing urinary tract infection in pediatric patients at Ayub Teaching Hospital Abbottabad. **J Ayub. Med. Coll. Abbottabad.**v. 17, p. 72-74, 2005.
- RAMOS, N.L.; et al. Characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* from children with urinary tract infection in different countries. **Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.**, v. 30, p. 1587-1593, 2011.
- REGUA-MANGIA, A. H.; et al. Molecular characterization of uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **J. Basic Microb.**, v. 50, p. S107-S115, 2010. Supplement.
- RIYUZO, M. C.; et al. Fatores associados à recorrência da infecção do trato urinário em crianças. **Ver. Bras. Saúde Materno Infantil.** v., 7, p. 151-157, 2007.
- ROCHA, S. P.; et al. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51(2), p. 319-326, 2007.
- RUSSO, T. A.; et al. Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. **J. Infect. Dis.** v. 172, p. 440–445, 1995.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753–1754, 2000.
- SADLER, I.; et al. A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. **J. Cell. Biol.**,v. 109, p. 2665–2675, 1989.
- SCALETSKY, M. L. M. S.; TRABULSI, L. R. Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa Cells. **Infection and Immunity.** V. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.
- SELANDER, R. K.; et al. Genetic Relationships and Clonal Structure of Strains of *Escherichia coli* Causing Neonatal Septicemia and Meningitis. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 213-222, 1986.
- SELANDER, R. K.; LEVIN, B.R. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. **Science**, v. 210, p. 545-547, 1980.
- SIEGMAN-IGRA, Y.; et al. Reappraisal of community-acquired bacteremia: a proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 1431–1439, 2002.
- STAMM, W. E.; NORRBY, R. S. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **J. Infect Dis.**, v. 183, p. S1-S4, 2001.
- SVANBORG, S.; GODALY, G. Bacterial virulence in urinary tract infection. **Infec. Dis. Clin. North Am.**, v. 11, p. 513-529, 1997.

TANEJA, N.; et al. Pediatric urinary tract infections in a tertiary care center from north India Indian. **J. Med. Res.**, v. 131, p. 101-105, 2010.

TENAILLON, O.; et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microb.** v. 8, p. 207-217, 2010.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo:Atheneu., 2004.

TRAMUTA, C.; et al. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. **J. Vet. Sci.**, v. 12, p. 49-55, 2011.

WELCH, R. A. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 521–528, 1991.

WILES, T. J.; et al. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp. Mol. Pathol.** v. 85, p. 11–19, 2008.

WINBERG, J.; et al. Epidemiology of symptomatic urinary tract infection in childhood. **Acta Paediatr. Scand.** , v. 252, p. 1-20, 1974.

YAMAMOTO, S.; et al. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Med. Microb.** v.12, p. 85–90, 1995.

YILMAZ, N.; et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *E. coli* in outpatient urinary isolates in Izmir, Turkey. **Med. Sci. Monit.**, v. 15, p. 161-165, 2009.

YÜKSEL, S.; et al. Antibiotic resistance of urinary tract pathogens and evaluation of empirical treatment in Turkish children with urinary tract infections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28, p. 413-416, 2006.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall International Inc., 1999, 718p.

ZERVOS, M. J.; et al. Relationship between fluoroquinolone use and changes in susceptibility to fluoroquinolones of selected pathogens in 10 United States teaching hospitals, 1991–2000. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 1643–1648, 2003.