

Aumento da freqüência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas

A.A. LOPES, K. SALGADO, R. MARTINELLI, H. ROCHA

Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA

RESUMO — OBJETIVO. Avaliar mudanças, ao longo dos anos, na freqüência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas de uroculturas.

MÉTODOS. Resultados de todas as uroculturas com crescimento bacteriano de pelo menos 10^5 unidades formadoras de colônias por mL de urina (UFC/mL), realizadas no Serviço de Nefrologia da Universidade Federal da Bahia durante o período 1983-1994, foram analisadas. As bactérias incluídas na análise foram aquelas mais freqüentemente isolados: *Escherichia coli* (n=668), *Klebsiella spp.* (n=286), *Staphylococcus spp.* (n=186), *Proteus spp.* (n=135) e *Enterobacter spp.* (n=129).

RESULTADOS. A freqüência de bactérias resistentes à norfloxacin foi de 3,2%, no período 1983-1986; 5,9%, no período 1987-1990; e 9,1%, no período 1991-1994 ($p<0,05$). *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* foram as bactérias que apre-

sentaram maiores aumentos na freqüência de resistência à norfloxacin. Para a ciprofloxacina, constatou-se resistência em 7,4% das bactérias isoladas, no período 1985-1989, e 16,5%, no período 1990-1994 ($p<0,05$). Esse aumento na freqüência de bactérias resistentes à ciprofloxacina foi mais marcante para *Enterobacter spp.* e *Staphylococcus spp.*

CONCLUSÕES. Os resultados do presente estudo mostram um aumento gradual na freqüência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina entre as bactérias mais comumente isoladas em uroculturas. A influência do uso prévio de quinolonas e de peculiaridades da bactéria infectante, nesses achados, representa importante questão a ser investigada.

UNITERMOS: Resistência antimicrobiana. Quinolonas. Infecção do trato urinário.

INTRODUÇÃO

As bactérias resistentes à múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções¹. A introdução de fluoroquinolonas, grupo ao qual pertencem a norfloxacin e ciprofloxacina, na década de 80, significou, sem dúvida, um avanço no tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, particularmente infecções do trato urinário (ITU)²⁻⁴, visto que diversas cepas de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos mostraram-se sensíveis a esse novo grupo de medicamentos^{5,6}. Trabalhos mais recentes, no entanto, têm alertado para um aumento da freqüência de bactérias resistentes às quinolonas⁷⁻¹⁰. Esse problema tem sido observado principalmente em pacientes com septicemias graves causadas por bactérias provenientes do trato urinário⁸⁻¹⁰. O presente estudo foi realizado com o objetivo básico de avaliar possíveis modificações, ao longo dos anos, na sensibilidade à norfloxacin e ciprofloxacina de bactérias isoladas de uroculturas provenientes de pacientes ambulatoriais e hospitalizados de um Hospital Universitário localizado em Salvador, BA.

MÉTODOS

Foi feito um levantamento de todas as uroculturas positivas ($\geq 10^5$ unidades formadoras de colônias por mL de urina, UFC/mL) para as espécies bacterianas mais freqüentemente isoladas (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.* e *Enterobacter spp.*) no período 1983-1994 e que foram testadas para a sensibilidade à norfloxacin ou ciprofloxacina no laboratório de bacteriologia da Disciplina de Nefrologia, Universidade Federal da Bahia. Esse laboratório recebe material proveniente tanto de pacientes ambulatoriais quanto hospitalizados.

Procedimentos microbiológicos — O jato médio da urina de cada paciente foi coletado em recipientes esterilizados no próprio laboratório. Após recebimento da amostra, realizava-se a semeadura direta da urina em meios de ágar sangue e McConkey com alça de platina calibrada (0,01mL), fazendo-se, no dia seguinte (18 a 24 horas), a contagem, na placa de ágar sangue, das colônias bacterianas surgidas¹¹⁻¹³. Em adição procedeu-se, nas fases iniciais do estudo (1983-1986), a diluição (1/1.000) da urina em solução salina fisiológica estéril, seguida

Tabela 1 – Distribuição percentual (%) das bactérias mais frequentemente isoladas em uroculturas por intervalos de 4 anos entre 1983 e 1994

Bactéria	1983-1986		1987-1990		1991-1994		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>E. coli</i>	282	41,5	197	52,7	189	53,8	668	47,6
<i>Klebsiella</i> spp.	156	23,0	67	17,9	63	17,9	286	20,4
<i>Staphylococcus</i> spp.	87	12,8	45	12,0	54	15,4	186	13,2
<i>Proteus</i> spp.	79	11,6	37	9,9	19	5,4	135	9,6
<i>Enterobacter</i> spp.	75	11,1	28	7,5	26	7,4	129	9,2
Total	679		374		351		1.404	

da inoculação em 10mL de ágar fundido e resfriado a 45°C¹³. Esse material era distribuído em placa de Petri estéril e incubado por 24 horas a 37°C. O número de colônias era novamente estimado em contador de colônias tipo Quebec Spencer¹³. Considerando a concordância entre os dois métodos de contagem de colônias, a partir de 1987 passou-se a usar apenas a inoculação da urina com a alça de platina, ficando o método da inoculação da urina diluída restrito aos estudos experimentais. Havendo crescimento de bactérias apenas em ágar sangue, eram feitas lâminas coradas pelo Gram. Quando se observava crescimento tanto em ágar sangue e Mc Conkey e sendo detectada a presença de bactérias gram-negativas, procedia-se a identificação através das seguintes provas bioquímicas: 1) fermentação de açúcares (glicose, sacarose e lactose); 2) produção de indol em caldo peptonado; 3) degradação de uréia; 4) motilidade em meio semi-sólido; e 5) utilização do citrato.

Após identificação das bactérias, realizavam-se os antibiogramas através do método de difusão do disco em ágar de Mueller-Hinton¹¹. Após o isolamento e identificação bacteriana, 4 a 5 colônias eram repicadas em caldo peptonado, incubadas em estufa bacteriológica por aproximadamente 6 horas e, na presença de crescimento bacteriano, evidenciado através de turvação do caldo, fazia-se comparação com uma solução padrão, baseada na escala de Mac Farland (suspensão de sulfato de bário, escala 0,5)^{11,12}. Os discos com antibióticos eram distribuídos na placa, de forma a manter uma distância de aproximadamente 24mm entre eles. Após esses procedimentos, as placas eram incubadas por 24 horas. A determinação do grau de sensibilidade bacteriana levou em consideração o diâmetro do halo seguindo orientações do National Committee for Clinical Laboratory Standards^{14,15}. Amostras de *E. coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) foram usadas para o controle de qualidade, seguindo recomendações do NCCLS¹¹⁻¹⁶.

Tabela 2 – Frequências (%) de resistência à norfloxacina distribuídas por intervalos de 4 anos

Período	Total	Resistentes	%*	Razão de frequência (RF)** (IC 95%)***
1983-1986	679	22	3,2	referência
1987-1990	374	22	5,9	1,8 (1,0 - 3,2)
1991-1994	351	32	9,1	2,8 (1,7 - 4,8)

*Qui-quadrado de Pearson=15,83; graus de liberdade=2; p<0,001. Qui-quadrado para tendência linear em proporções=15,77; grau de liberdade=1; p<0,0001. **RF=frequência de cada período dividida pela frequência do período de referência, 1983-1986. ***IC 95%=Intervalo de confiança de 95%.

Análise dos dados — Para a norfloxacina, usou-se o período 1983-1986 como base para avaliação da modificação na frequência de resistência bacteriana. Por outro lado, para a ciprofloxacina, um antimicrobiano introduzido para o tratamento de ITU mais recentemente do que a norfloxacina, o período 1985-1989 foi usado como base para comparações. Procedimentos do software de estatística, *Statistical Package for the Social Sciences*, SPSS¹⁷, foram usados para a análise dos dados. A razão de frequência (RF) de resistência foi determinada através da divisão da frequência de bactérias resistentes em um determinado período pela frequência no período de base (1983-1986 para a norfloxacina e 1985-1989 para a ciprofloxacina). Portanto, uma RF igual a 1,0 significa que não houve mudança na frequência de resistentes entre os períodos. Desvios da RF do valor 1,0 indica em quantas vezes, maior ou menor, foi a frequência de resistentes em um determinado período, quando comparada com o período de base. A precisão da RF foi descrita através dos intervalos de confiança de 95% (IC 95%). A significância estatística da associação entre resistência bacteriana e o período foi avaliada através do teste do qui-quadrado de Pearson ou do teste exato de Fischer, quando as exigências para o uso do qui-quadrado não foram preenchidas¹⁸. Para avaliar a significância estatís-

Tabela 3 – Frequência (%) de resistência à norfloxacin de acordo com o período (1987-1994 vs. 1983-1986) e o tipo de bactéria

Bactéria	1983-1986 (Período 1)			1987-1994 (Período 2)			Razão de frequência (RF)* (IC 95%)**	Significância estatística
	Total	Resistentes	%	Total	Resistentes	%		
<i>E. coli</i>	282	2	0,7	386	5	1,3	1,8 (0,4 - 9,4)	NS***
<i>Klebsiella spp.</i>	156	4	2,6	130	19	14,6	5,7 (2,0 - 16,3)	p<0,01
<i>Staphylococcus spp.</i>	87	13	14,9	99	23	23,2	1,6 (0,8 - 2,9)	NS
<i>Proteus spp.</i>	79	1	1,3	56	1	1,8	1,4 (0,1 - 22,1)	NS
<i>Enterobacter spp.</i>	75	2	2,7	54	6	11,1	4,2 (0,8 - 2,9)	0,05<p<0,1
Total	679	22	3,2	725	54	7,4	2,3 (1,4 - 3,70)	p<0,01

*RF=frequência do período 2 (1987-1994) dividida pela frequência do período 1 (1983-1986). **IC 95%=Intervalo de confiança de 95%. ***NS=estatisticamente não-significante (p>0,1).

Tabela 4 – Frequência (%) de resistência à ciprofloxacina de acordo com o período (1990-1994 vs. 1985-1989) e o tipo de bactéria

Bactéria	1985-1989 (Período 1)			1990-1994 (Período 2)			Razão de frequência (RF)* (IC 95%)**	Significância estatística
	Total	Resistentes	%	Total	Resistentes	%		
<i>E. coli</i>	218	9	4,1	159	5	3,1	0,8 (0,3 - 2,2)	NS***
<i>Klebsiella spp.</i>	88	9	10,2	61	12	19,7	1,9 (0,9 - 4,3)	NS
<i>Staphylococcus spp.</i>	46	11	23,9	55	30	54,5	2,3 (1,3 - 4,0)	p<0,01
<i>Proteus spp.</i>	50	2	4	17	0	-	- NS	
<i>Enterobacter spp.</i>	44	2	4,5	18	4	22,2	4,9 (1,0 - 24,4)	0,05<p<0,1
Total	446	33	7,4	310	51	16,5	2,2 (1,5 - 3,4)	p<0,01

*RF=frequência do período 2 (1990-1994) dividida pela frequência do período 1 (1985-1989). **IC 95%=Intervalo de confiança de 95%. ***NS=estatisticamente não-significante (p>0,1).

tica na modificação da resistência à norfloxacin ao longo de três períodos, foi também utilizado o teste do qui-quadrado para tendência linear em proporções (extensão de Mantel-Haenszel)¹⁹. Uma probabilidade de erro tipo I, “bicaudal”, menor do que 0,05, foi considerada estatisticamente significativa; quando a probabilidade do erro tipo 1 ficou entre 0,05 e 0,1, a associação entre resistência bacteriana e período foi considerada moderadamente significativa.

RESULTADOS

No período 1983-1994 (tabela 1), *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.* e *Enterobacter spp.* foram, nessa ordem, as espécies bacterianas mais frequentemente isoladas em uroculturas. Um pequeno predomínio na frequência de *Enterobacter spp.* (7,4%) relativa à frequência de *Proteus spp.* (5,4%) foi, no entanto, observado no período 1991-1994.

Houve um aumento estatisticamente significativo (p<0,001) na frequência de bactérias resistentes à norfloxacin ao longo dos anos (tabela 2). No período 1983-1986, a frequência de resistentes foi de 3,2%. Comparativamente a esse período inicial, ocorreu um aumento de 1,8 (5,9%/3,2%)

vez no percentual de bactérias resistentes, no período 1987-1990, e de 2,8 (9,1%/3,2%) vezes no período 1991-1994.

A tabela 3 compara as frequências de bactérias resistentes à norfloxacin no período 1987-1994 com o período 1983-1986. A frequência de resistentes foi 2,3 vezes maior (p<0,01) no período 1987-1994 (7,4%), quando comparada com aquela do período 1983-1986 (3,2%). Esse aumento no encontro de bactérias resistentes foi observado para cada uma das espécies estudadas; no entanto, para *Escherichia coli*, *Proteus spp.* e *Staphylococcus spp.*, os valores da RF não alcançaram significância estatística (p>0,1). *Klebsiella spp.* foi a bactéria que apresentou o aumento mais acentuado no surgimento de cepas resistentes (RF=5,7; IC 95%=2,0-16,3; p<0,01) entre os dois períodos. *Enterobacter spp.* ocupou a segunda posição, embora a RF (4,2) tenha sido apenas moderadamente significativa (0,05<p<0,1).

As frequências de resistência à ciprofoxacin por intervalos de cinco anos são mostradas na tabela 4. Bactérias resistentes a esse antimicrobiano, no período 1990-1994 (16,5%), foi 2,2 vezes maior (p<0,01) do que no período 1985-1989 (7,4%). No entanto, diferente do que foi descrito para a norfloxacin, não houve uniformidade na

direção da modificação da resistência à ciprofloxacina nas comparações específicas para cada espécie bacteriana.

Klebsiella spp., *Enterobacter* spp. e *Staphylococcus* spp. foram as bactérias que apresentaram maior aumento da resistência à ciprofloxacina ao longo dos anos (tabela 4). Ao comparar-se o período 1990-1994 com o período 1985-1989, observou-se um aumento de resistência de aproximadamente duas vezes para a *Klebsiella* spp. e *Staphylococcus* spp. ($p < 0,05$) e de aproximadamente cinco vezes para o *Enterobacter* spp.; no entanto, a RF não alcançou significância estatística ($p > 0,1$) para a *Klebsiella* spp., e foi moderadamente significativa ($0,05 > p > 0,1$) para o *Enterobacter* spp. É importante observar que não se constatou aumento da resistência à ciprofloxacina para a *Escherichia coli* e *Proteus* spp.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo chamam atenção para um aumento da resistência à norfloxacina e ciprofloxacina, ao longo dos anos, entre as bactérias mais freqüentemente isoladas em uroculturas. No entanto, o padrão da modificação da resistência bacteriana não foi uniforme entre os diferentes tipos de bactérias.

O rápido aumento da freqüência de *Klebsiella* spp. resistente à norfloxacina é um dado preocupante, principalmente se for considerado que esse agente infectante é um dos mais freqüentemente isolados em pacientes com ITU. As modificações na resistência da *Klebsiella* spp. e do *Proteus* spp. foram muito mais acentuadas para a norfloxacina do que para a ciprofloxacina. Embora o número pequeno de casos seja insuficiente para uma conclusão segura, é interessante observar a ausência de casos de *Proteus* spp. resistente à norfloxacina no período 1990-1994.

Escherichia coli apresentou uma das freqüências mais baixas de resistência bacteriana e pequena modificação na sensibilidade à norfloxacina e ciprofloxacina, nos períodos estudados. Esse dado pode ser visto como animador, principalmente ao se levar em consideração que *Escherichia coli* é ainda a bactéria mais freqüentemente isolada em pacientes com ITU. No entanto, diversos investigadores têm chamado atenção para o crescimento lento da resistência da *Escherichia coli* à norfloxacina, ciprofloxacina e outras quinolonas, o que parece estar, em parte, relacionado ao uso freqüente desses antimicrobianos na profilaxia de infecções e na terapia de ITU²⁰.

A freqüência elevada de *Staphylococcus* spp. resistentes à norfloxacina e ciprofloxacina, desde a época em que foram introduzidas, é consistente com o que tem sido descrito em diversos tipos de infecção^{21,22}, incluindo ITU^{23,24}. É importante observar que existem indicações que essas cepas de *Staphylococcus* resistentes à norfloxacina e ciprofloxacina são mais freqüentemente resistentes a diversos outros antimicrobianos²¹.

Não foi possível avaliar, diretamente, os fatores que influenciaram o aumento da resistência das bactérias estudadas às quinolonas. No entanto, os dados existentes na literatura sugerem que o uso prévio de quinolonas exerce um importante papel no crescimento de bactérias resistentes a esses antimicrobianos²⁵. O papel do uso prévio de quinolonas e de certas peculiaridades da bactéria infectante no aumento da resistência à norfloxacina e ciprofloxacina deve ser visto como uma importante questão para ser explorada em pesquisas futuras.

SUMMARY

Increase in the frequency of norfloxacin and ciprofloxacin resistance of bacteria isolated from urine culture

OBJECTIVE. To assess time trends in the frequency of norfloxacin and ciprofloxacin resistance of bacteria isolated from urine culture.

METHODS. Results of all urine cultures with a bacterial growth of at least 10^5 colony-forming units per milliliter, performed at the Renal Service of the Federal University of Bahia, Brazil, from 1983 to 1994 were analyzed. The bacteria considered for this analysis were those most often isolated: *Escherichia coli* ($n=668$), *Klebsiella* spp. ($n=286$), *Staphylococcus* spp. ($n=186$), *Proteus* spp. ($n=135$) and *Enterobacter* spp. ($n=129$).

RESULTS. The frequencies of norfloxacin resistance for the periods 1983-1986, 1987-1990 and 1991-1994 were 3.2%, 5.9% and 9.1%, respectively (p -value <0.05). The most pronounced increases in the frequencies of norfloxacin-resistance were observed for *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. The frequency of ciprofloxacin resistance was 7.4% in the period 1985-1989 and 16.5% in the period 1990-1994 (p -value <0.05). This time trend in ciprofloxacin resistance was more striking for *Enterobacter* spp. and *Staphylococcus* spp.

CONCLUSION. The results show a gradual increase in the frequency of norfloxacin and ciprofloxacin resistance of the bacteria most commonly isolated from urine cultures. The influence of

previous treatment with quinolones and characteristics of the infecting bacteria on these findings are important questions to be addressed in future investigations. [Rev Ass Med Brasil 1998; 44(3): 196-200.]

KEY WORDS: Antimicrobial resistance. Quinolone. Urinary tract infection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray BE. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. *J Infect Dis* 1991; 163: 1.185-94.
2. Ryan JL, Berenson CS, Greco TP et al. Mangi RJ, Sims M, Thornton GF, Andriole VT. Oral ciprofloxacin in resistant urinary tract infections. *Am J Med* 1987; 82: 303-6.
3. Tolckoff NE, Rubin RH. New approaches to the treatment of urinary tract infection. *Am J Med* 1987; 82: 270-7.
4. Daikos GL, Kathpalia SB, Sharifi R, Lolans VT, Jackson GG. Comparison of ciprofloxacin and beta-lactam antibiotics in the treatment of urinary tract infections and alteration of fecal flora. *Am J Med* 1987; 82: 290-4.
5. Neu HC. Ciprofloxacin: an overview and prospective appraisal. *Am J Med* 1987; 82: 395-404.
6. Neu HC. Quinolones: a new class of antimicrobial agents with wide potential uses. *Med Clin North Am* 1988; 72: 623-36.
7. Hooper DC, Wolfson JS. Bacterial resistance to the quinolone antimicrobial agents. *Am J Med* 1989; 87: 17S-23S.
8. Carratala J, Fernandez-Sevilla A, Tubau F, Callis M, Gudiol F. Emergence of quinolone-resistant *Escherichia coli* bacteremia in neutropenic patients with cancer who have received prophylactic norfloxacin. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 557-60.
9. Pena C, Albareda JM, Pallares R et al. Relationship between quinolone use and emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 520-4.
10. Cometta A, Calandra T, Bille J, Glauser MP. *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones in patients with cancer and neutropenia. *New Engl J Med* 1994; 330: 1.240-1.
11. Finegold SM, Martin WJ. *Diagnóstico microbiológico*. Editora Médica Panamericana, São Paulo, SP, 1983.
12. Bier O. *Microbiologia e imunologia*. Editora Melhoramentos, São Paulo, SP, 1984.
13. Huvos A, Rocha H. Frequency of bacteriuria in patients with diabetes mellitus: a controlled study. *New Eng J Med* 1959; 261: 1.213-6.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standards*. NCCLS 1979; document no. ASM-2.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Villanova, Pa: NCCLS 1984; document no. M2-A3.
16. NCCLS Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Standard methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria which grow aerobically*. Proposed standards. NCCLS 1990; document PSM-7.
17. Norušis MJ. *SPSS for Windows: Base System User's Guide*, release 6.0, SPPS Inc, Chicago, IL, 1993.
18. Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*, 2nd edition. John Wiley & Sons, New York, NY, 1981.
19. Schlesselman. *Case-control studies*. New York, Oxford Univ. Press, 1982; 203-6.
20. Richard P, Delangle MH, Merrien D et al. Fluoroquinolone use and fluoroquinolone resistance: is there an association? *Clin Infect Dis* 1994; 19: 54-9.
21. Blumberg HM, Rimland D, Carrolli DJ, Terry P, Wachsmuth K. Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1991; 163: 1.279-85.
22. Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2.400-4.
23. Waites K, Rand K, Jenkins S et al. Multicenter *in vitro* comparative study of fluoroquinolones after four years of widespread clinical use. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 18: 181-9.
24. Coronado VG, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Ciprofloxacin resistance among nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 71-5.
25. Muder RR, Brennen C, Goetz AM, Wagener MM, Rihs JD. Association with prior fluoroquinolone therapy of widespread ciprofloxacin resistance among gram-negative isolates in a Veterans Affairs medical center. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 256-8.