



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

FLAVIANE BEATRIZ MARCELINO LARA

**Genotipagem de cepas de *Escherichia coli* uropatogênica
(UPEC) isoladas no Hospital Regional de Ceilândia no
Distrito Federal**

BRASÍLIA, DF

2014

FLAVIANE BEATRIZ MARCELINO LARA

Genotipagem de cepas de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) isoladas no Hospital Regional de Ceilândia no Distrito Federal

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira

BRASÍLIA, DF

2014

FLAVIANE BEATRIZ MARCELINO LARA

**Genotipagem de cepas de *Escherichia coli* uropatogênica
(UPEC) isoladas no Hospital Regional de Ceilândia no
Distrito Federal**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^o. Dr^o. Alex Leite Pereira
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a. Larissa Fernandes Matos
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a Daniela Castilho Orsi
(FCE/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2014

Aos meus amados pais, Suzana e Jorge.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Agradeço por Seu amor eterno que foi o meu sustento e me manteve firme nessa caminhada. Agradeço também porque em nenhum momento o Senhor desviou o olhar das minhas fraquezas e das minhas dificuldades.

Agradeço aos meus queridos pais, Suzana e Jorge, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e se fizeram presentes em todos os momentos da minha vida. Obrigada, mãe e pai, pelo amor, pelo carinho, pela paciência e por me oferecerem tudo para que hoje eu pudesse viver esse momento. Sem vocês, com certeza eu não teria chegado até aqui. Obrigada pelos conselhos, por serem minhas referências e meus exemplos. Obrigada por me ensinarem a ser humilde e a nunca desistir dos meus sonhos. Afinal a vida sem ser sonhada não faz o menor sentido.

Agradeço aos meus irmãos, Fabrício, Fabiane e Flávia, por essa amizade que compartilhamos. Obrigada, de coração, por estarem sempre dispostos a ajudar quando preciso, pelas palavras de incentivo e pelos conselhos que por muitas vezes me guiaram em inúmeras decisões.

Agradeço ao meu namorado pela compreensão e por ser essa pessoa que me faz feliz. Obrigada por sempre me incentivar e me apoiar na minha vida profissional.

Quero agradecer também meu orientador que me apresentou a microbiologia e me fez descobrir minha vocação. Obrigada pela confiança, por sempre acreditar em mim e por me arrumar mais trabalho quando eu acho que terminei tudo. Agradeço pela paciência ao ensinar, pelo conhecimento compartilhado, por nos últimos anos ter sido meu professor/amigo de todas as horas.

Por fim quero agradecer aos meus queridos amigos e a todos que de alguma maneira contribuíram para essa conquista.

RESUMO

Escherichia coli uropatogênica (UPEC) é o principal patógeno associado a infecções do trato urinário (ITU). Cepas de UPEC podem promover infecções urinárias recorrentes, pielonefrites e até mesmo quadros infecciosos mais graves como a meningite neonatal e a sepse de origem urinária. A patogênese da ITU, e de quadros correlatos, pode ser explicada por meio da genotipagem de fatores de virulência associados à UPEC. O objetivo desse trabalho foi caracterizar cepas de *E. coli* isoladas de casos de ITU atendidos no pronto-socorro e na internação do Hospital Regional de Ceilândia (HRC). Foram testados 16 genes preditores de 4 patotipos de *E. coli* (UPEC, EAEC, MNEC e EHEC) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Também foram realizados ensaios para avaliar a formação de biofilme em amostras de urina com diferentes genótipos identificados. Os genes mais frequentemente detectados foram *chuA* (78%), *csgA* (76%) e *fyuA* (69%). O gene *pap* (fímbria associada à pielonefrite) foi estatisticamente associado aos casos de ITU atendidos no pronto-socorro. Genes de EAEC foram detectados em 4 (5%) das cepas de UPEC. Cepas de UPEC isoladas de crianças mostraram-se mais virulentas (6 genes em média/cepa) do que cepas recuperadas de adultos (3 genes/cepa) ($p \leq 0,01$). Genótipos híbridos (EAEC/UPEC) foram detectados em 3 cepas. Dentre os genótipos testados, a combinação de *fyuA*, *chuA* e *csgA* foi frequentemente detectada nas cepas que apresentaram melhor capacidade de formar biofilmes. Cepas de *E. coli* associadas a infecção urinária são marcadas pela heterogeneidade genética.

Palavras-chave: cepas heteropatogênicas, biofilme, genotipagem, fatores de virulência.

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main pathogen associated with urinary tract infection (UTI). *E. coli* strains can cause recurring urinary infection episodes, pyelonephritis and even more severe infectious diseases, such as neonatal meningitis and urinary sepsis. UTI pathogenesis and the correlated clinical settings can be explained through the genotyping of UPEC virulence factors. The aim of this study was to characterize *E. coli* strains isolated from UTI patients who were admitted to the emergency or were hospitalized at Hospital Regional de Ceilândia (HRC). Sixteen predictor genes of 3 *E. coli* pathotypes (UPEC, EAEC and MNEC) were tested by using polymerase chain reaction (PCR). Experiments were also performed to analyze biofilm formation in urine samples with different identified genotypes. The most frequently identified genes were *chuA* (78%), *csgA* (76%) e *fyuA* (69%). *pap* gene (fimbria associated with pyelonephritis) was statistically associated with cases of UTI admitted to the emergency room. EAEC genes were detected in 4 UPEC strains (5%). UPEC strains isolated from children were found to be more virulent (6 genes in average/strain) than the strains isolated from adults (3 genes/strain) ($p \leq 0,01$). Hybrid genotypes (EAEC/UPEC) were identified in 3 strains. Among the tested genotypes, the combination *fyuA chuA* and *csgA* was most frequently found in strains which displayed a higher ability to form biofilm. *E. coli* strains associated with urinary infection are characterized by genetic heterogeneity.

Keywords: heteropathogenic strains, biofilm, genotyping, virulence factors.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVO	21
3.1. OBJETIVO GERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. COMITÊ DE ÉTICA	22
4.2. COLETA DAS AMOSTRAS E DADOS	22
4.3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	23
4.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	23
4.5. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	24
4.5.1 COLETA DE AMOSTRAS DE URINA	24
4.5.2. FORMAÇÃO DE BIOFILMES	25
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	45
7. PERSPECTIVAS	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1- Classificação das infecções do trato urinário em virtude dos sítios anatômicos afetados

Figura 2 – Patogênese da infecção do trato urinário por *E. coli* uropatogênica.

Gráfico 1 – Distribuição etária e área de atendimento dos casos de ITU atendidos no HRC

Gráfico 2 – Número de genes de virulência em cepas de UPEC recuperadas de diferentes faixas etárias.

Gráfico 3 – Carga de virulência em cepas de UPEC isoladas de pacientes em diferentes faixas etárias.

Gráfico 4 – Amostras diferentes de urina promovem a formação de biofilmes em intensidade variável quando testadas com uma mesma coleção de cepas de UPEC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição e evidências experimentais de genes de virulência selecionados em *E. coli*

Tabela 2 – *Primers* utilizados para detecção dos fatores de virulência.

Tabela 3 – Características associadas aos casos de ITU detectados no HRC.

Tabela 4 – Frequência dos fatores de virulência em cepas de UPEC isoladas de pacientes atendidos no pronto-socorro ou internados.

Tabela 5 – Frequência dos fatores de virulência em cepas de UPEC isoladas de diferentes faixas etárias.

Tabela 6 – Distribuição em frequência dos fatores virulência de UPEC em função das alterações visualizadas no EAS

Tabela 7 – Genótipos detectados em cepas de UPEC isoladas no HRC

Tabela 8 – Formação de biofilme* por genótipos selecionados de cepas de UPEC em diferentes amostras de urina.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- DAEC - *Escherichia coli* adesão difusa
- EAEC- *Escherichia coli* enteroagregativa
- EAHEC - *Escherichia coli* enteroagregativa-hemorrágica
- EAS - Elementos Anormais do Sedimento urinário
- EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
- ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
- HRC - Hospital Regional de Ceilândia
- ITU - Infecção do trato urinário
- µL – microlitro
- mL – mililitro
- MNEC - *Escherichia coli* associada à meningite neonatal
- PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
- RCF – Força Centrífuga Relativa
- rpm – Rotações por minuto
- SUH- Síndrome urêmica hemolítica
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
- UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

1. INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) trata-se da segunda mais frequente infecção em seres humanos (STAPLETON, 2014). A maioria das infecções urinárias é causada por enterobactérias, bacilos Gram negativos provenientes da microbiota intestinal, que transitam constantemente para o trato genito-urinário, ascendo para uretra e bexiga. As ITU possuem maior incidência no sexo feminino em virtude da anatomia feminina, que apresenta uretra mais curta e maior proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal (VALIQUETTE, 2001). Em crianças, especialmente nos primeiros anos de vida, a ITU também é muito comum, o que pode estar associado à facilidade de contaminação das vias urinárias por agentes da microbiota intestinal durante a higienização e a malformações congênitas (BHAT; KATY; PLACE, 2011). Além disso, os idosos também representam um grupo etário com alta prevalência de ITU, devido à queda da imunidade, doenças crônicas e também hospitalizações (STAPLETON, 2014).

A ITU é habitualmente classificada como complicada e não complicada, de acordo com sua gravidade (HOOTON & STAMM, 1997). Do ponto de vista anatômico, as não complicadas comprometem estruturas da via urinária inferior, ou seja, uretra e bexiga, e são chamadas de cistites; enquanto as complicadas afetam também as vias urinárias superiores, ureteres e rins, e são chamadas de pielonefrites, como demonstra a figura 1 (RONALD & HARDING, 1997; VALIQUETTE, 2001). Clinicamente, a ITU também é considerada complicada quando ocorrem alterações estruturais ou funcionais do aparelho urinário (HOOTON & STAMM, 1997).

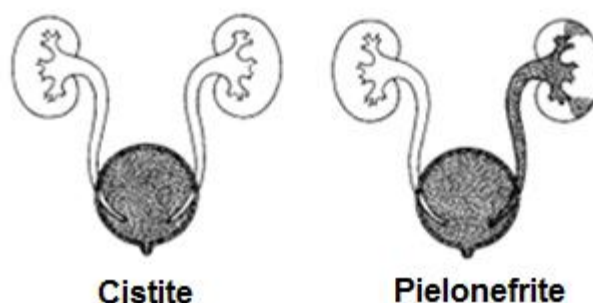


Figura 1 - Classificação das infecções do trato urinário em virtude dos sítios anatômicos afetados. Fonte: Adaptado de RUSHTON *et al.*, 1992

A cistite é o tipo de ITU mais comum na fase adulta; enquanto que nas crianças, a pielonefrite é predominante devido à presença do refluxo vésico-ureteral, por imaturidade do mecanismo antirrefluxo vesical ou ureteral; ou ainda devido à dissinergia da musculatura vesical e esfíncteriana (TULLUS, 2014).

A ITU é caracterizada na colonização microbiana da urina que pode estar associada à invasão tecidual de qualquer estrutura do aparelho urinário, tendo como principais sintomas a disúria, polaciúria, urgência miccional, dor abdominal e/ou lombar (STAPLETON, 2014). As infecções geralmente são marcadas pela bacteriúria e piúria. A bacteriúria é definida como a presença de bactérias em quantidade maior ou igual a 10^5 unidades formadoras de colônias por mL de urina (UFC/mL) colhida em jato médio e de maneira asséptica, detectada por meio da urocultura. Segundo Kass, a piúria pode ser entendida como a contagem maior que 5 leucócitos por campo em um aumento de 40 vezes, através do exame de Elementos Anormais do Sedimento urinário (EAS) (KASS, 1960; KASS, 1962). Outras alterações no EAS como a presença de nitrito podem caracterizar um quadro de infecção urinária, indicando a ação de bactérias redutoras de nitrato, geralmente enterobactérias. A presença de hemácias também pode estar relacionada a irritação ou lesão de estruturas da via urinária em virtude de quadros infecciosos.

Os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos com ITU são *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, espécies de *Proteus* e de *Klebsiella* e *Enterococcus faecalis*, sendo que a espécie *E. coli* responde por 70 a 85% das infecções do trato urinário adquiridas na comunidade (BISHARA *et al.*, 1997).

E. coli é uma das espécies bacterianas mais versáteis conhecidas e também uma das mais bem estudadas. Embora tenha como habitat primário o intestino de animais vertebrados, onde usualmente atua como organismo comensal, esta espécie é amplamente distribuída na natureza tendo como habitat secundário a água e diversos sedimentos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Cepas comensais de *E. coli* colonizam o trato gastrointestinal dos humanos poucas horas após o nascimento permanecendo restritas ao íleo distal e ao colo (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Enquanto as cepas de *E. coli* permanecem restritas ao lúmen intestinal e à camada externa do muco intestinal, a maior parte do tempo elas participam de uma relação de simbiose com seu hospedeiro (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998). As cepas comensais de *E. coli* raramente

causam doença exceto quando a barreira gastrointestinal é violada. Contudo, existem clones de *E. coli* que evoluíram com a aquisição de inúmeros fatores de virulência que contribuem para a adaptação de linhagens patogênicas a diferentes sítios de colonização em humanos, permitindo que *E. coli* produza um amplo espectro de infecções (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO & KAPER, 1998; PEREIRA *et al.*, 2007).

Essa diversidade de comportamentos encontrada nessa espécie é sustentada pela sua alta plasticidade genética que permite a aquisição e a perda de atributos genéticos por meio de eventos de transferência horizontal de genes, dentre eles a conjugação (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Cepas de *E. coli* apresentam um genoma formado por quase 2.000 genes, no entanto, são conhecidos pelo menos 10.000 genes em *E. coli* (CLERMONT *et al.*, 2011). Fatores de virulência podem ser transferidos para linhagens específicas de *E. coli*, originando clones altamente adaptados capazes de causar doenças em indivíduos saudáveis. Apenas as combinações genéticas de melhor sucesso adaptativo persistem e passam a compor as chamadas categorias patogênicas de *E. coli*, ou patotipos de *E. coli* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Infecções por patotipos de *E. coli* não se limitam à mucosa intestinal, seu habitat primário, e podem atingir sítios extra-intestinais. Em humanos três síndromes clínicas estão frequentemente associadas a patotipos de *E. coli*: doenças entéricas/diarreicas; infecções do trato urinário e sepse/meningite. Dentre os patógenos intestinais, atualmente são reconhecidos pelo menos seis patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO & KAPER, 1998). Dentre os patotipos extra-intestinais, são, claramente, reconhecidos *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associada a meningite/sepse (MNEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A classificação dos patotipos de *E. coli* está baseada na detecção molecular de arranjos específicos de genes de virulência associados à adesão bacteriana (fímbrias e adesinas patotipo-específicas); a toxinas e hemolisinas; a sistemas de secreção, e a sistemas de aquisição de ferro (sideróforos) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO & KAPER, 1998).

Esses fatores de virulência podem ser codificados por genes cromossomais que são, muitas vezes, parte de regiões cromossômicas grandes e instáveis

conhecidas como ilhas de patogenicidade (BLUM-OEHLER *et al.*, 2000; HACKER *et al.*, 1997). Alguns genes de virulência estão também localizados em elementos móveis como plasmídeos e transposons (BEKAL *et al.*, 2003). Esses genes possuem um papel fundamental na colonização e invasão de tecidos humanos, como demonstra a tabela 1 que expõe fatores de virulência associados a categorias patogênicas de *E. coli* relacionando-os a evidências experimentais. Em relação aos patótipos extra-intestinais de *E. coli*, os genes (*fyuA*, *yfcV* e *chuA*) são descritos como preditores do potencial uropatogênico em cepas de *E. coli*, ao passo que os genes *sfa* e *cnf* são marcadores de virulência associados a infecção do sistema nervoso central. Marcadores associados a categorias diarreio gênicas de *E. coli* também são conhecidos (Tabela 1) (SPURBECK *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Descrição e evidências experimentais de genes de virulência selecionados em *E. coli*

Categoria Patogênica	Gene de virulência	Descrição
<i>E. coli</i> (Vários patotipos)	<i>csgA</i>	Fímbrias finas agregativas (curli)
	Evidências experimentais: 1- envolvidas com adesão a células da mucosa e formação de biofilmes. 2- papel importante adesão de matriz extracelular e colonização da região perianal (EMODY; KERENYI; NAGY, 2003; WESTERLUND; KORHONEN, 1993).	
	<i>ag43</i>	Adesina para auto-agregação bacteriana
		Evidência experimental: 1- em modelo de infecção animal (rato) revelou papel em persistência de longo prazo no trato urinário (LUTHJE; BRAUNER, 2010).
<i>E. coli</i> diarreio gênica (EAEC)	<i>pCVD</i>	Sonda para plasmídio de virulência pAA
	<i>aggR</i>	Ativador de virulência
	<i>pilS</i>	Pilina
	Evidências experimentais: 1 - envolvidas no processo de adesão agregativa (DUDLEY <i>et al.</i> , 2006).	
	<i>pic</i>	Proteína envolvida na colonização (mucinase)
	Evidências experimentais: 1- atividade mucolítica através da serina protease. 2- estimula a hipersecreção de muco (NAVARRO-GARCIA <i>et al.</i> , 2010).	
	<i>pet</i>	Citotoxina
		Evidências experimentais: 1 – exerce atividade citotóxica, podendo levar a alterações do citoesqueleto de células epiteliais (NAVARRO-GARCIA <i>et al.</i> , 1999).
<i>E. coli</i> associada a meningite neonatal (MNEC)	<i>sfa</i>	Fímbria S
	Evidência experimental: em modelo animal (rato) promove a adesão ao endotélio vascular, células epiteliais do plexo coróide e ventrículos cerebrais (PARKKINEN <i>et al.</i> , 1988)	
	<i>cnf</i>	Fator necrosante citotóxico
		Evidência experimental: cepas mutantes demonstraram a participação de CNF na invasão da barreira hemato-encefálica de ratos (BADGER <i>et al.</i> , 2000)
<i>E. coli</i> uropatogênica (UPEC)	<i>fyuA</i>	Receptor de sideróforo (yersiniabactina)
	Preditor estatístico de UPEC. Evidência experimental: facilita a colonização da bexiga em modelo animal e é expresso durante o crescimento em urina humana (SPURBECK <i>et al.</i> , 2012)	
	<i>yfcV</i>	Gene do operon codificador da fímbria YFC
	Preditor estatístico de UPEC. Evidências experimentais: 1-facilita a colonização da bexiga em modelo animal e é expresso durante o crescimento em urina humana. 2- aumenta a adesão bacteriana a células de bexiga humana (T24) (KOREA <i>et al.</i> , 2010; SPURBECK <i>et al.</i> , 2012)	
	<i>chuA</i>	Proteína ligadora de grupo heme
	Preditor estatístico de UPEC. Evidência experimental: facilita a colonização da bexiga em modelo animal e é expresso durante o crescimento em urina humana (SPURBECK <i>et al.</i> , 2012)	
	<i>vat</i>	Toxina vacuolizante
	Evidência experimental: facilita a colonização da bexiga em modelo animal e é expresso durante o crescimento em urina humana (SPURBECK <i>et al.</i> , 2012)	
	<i>focA</i>	Fímbria F1C
Evidências experimentais: 1- exerce importante papel na formação de biofilme em cepas comensais. 2- aumenta a adesão bacteriana a células da bexiga e células tubulares renais (LASARO <i>et al.</i> , 2009; MARRE; KREFT; HACKER, 1990; OTT <i>et al.</i> , 1988).		
<i>pap</i>	Fímbria P	
Evidências experimentais: 1- em modelo de infecção animal (rato) está associado à alta piúria e é o principal determinante de colonização e invasão da bexiga e do trato urinário superior. 2- epidemiologicamente associado à pielonefrite (JOHNSON, 1991).		
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	<i>hlyA</i>	Hemolisina
	Evidências experimentais: 1- exfoliação das células da bexiga através da proteólise de fatores de adesão celular. 2- em modelo de infecção animal (rato) foi observada ação supressora das respostas inflamatórias e desativação de macrófagos (DHAKAL; MULVEY, 2012; JERMY, 2012).	

Enquanto algumas linhagens genéticas de *E. coli* tendem a manter um arranjo genético constante ao longo da evolução (ex.: EHEC O157, EPEC O111), outras são marcadas pela heterogeneidade genética, principalmente associada aos genes de virulência (BIELASZEWSKA *et al.*, 2014; MANSAN-ALMEIDA; PEREIRA; GIUGLIANO, 2013; PEREIRA *et al.*, 2007). Esta versatilidade genética apresentada por alguns clones de *E. coli* tem proporcionado a emergência de novas categorias patogênicas de *E. coli*, geralmente marcadas pela combinação de fatores de virulência de patotipos diferentes, fato que passou a ser chamado de heteropatogenicidade (BIELASZEWSKA *et al.*, 2014; TOVAL *et al.*, 2014). Em 2011, a Europa registrou um grande surto envolvendo casos de diarreia associados à síndrome urêmica hemolítica (SUH) que foi provocado pela emergência de um patotipo incomum de *E. coli*. Esta cepa foi caracterizada como um híbrido de duas categorias de *E. coli* (EAEC e EHEC) e foi denominada de *E. coli* enteroagregativa-hemorrágica (EAHEC) (BRZUSZKIEWICZ *et al.*, 2011).

No tocante a patogênese e tendo como foco as cepas de *E. coli* uropatogênicas (UPEC), é possível dizer que, ao alcançarem o trato urinário as cepas de UPEC enfrentam diversos mecanismos de defesa que incluem o fluxo da urina, numerosas moléculas anti-bacterianas e o influxo de células imunes. Para superar ou evitar essas defesas e persistir na colonização das vias urinárias, cepas de UPEC desenvolveram uma série de mecanismos para aderir e invadir as mucosas do trato urinário estimulando resposta inflamatória deletéria ao hospedeiro (GUAY, 2008; ZHAO *et al.*, 2009). A bem-sucedida utilização destes mecanismos de virulência por cepas de UPEC é refletida, em parte, pela prevalência e recorrência de infecções do trato urinário (ITU), o que posiciona este agente etiológico como a principal causa de ITU. A figura 2 demonstra a atuação de vários fatores de virulência em diferentes estágios da infecção urinária. Na figura, é possível observar a relação direta entre a presença desses fatores e a gravidade do quadro infeccioso ao ilustrar a ascensão da *E. coli* pelas vias urinárias por meio da expressão coordenada de diferentes fatores de virulência, o que possibilita o alcance da corrente sanguínea e a possibilidade de levar a quadros de sepse urinária.

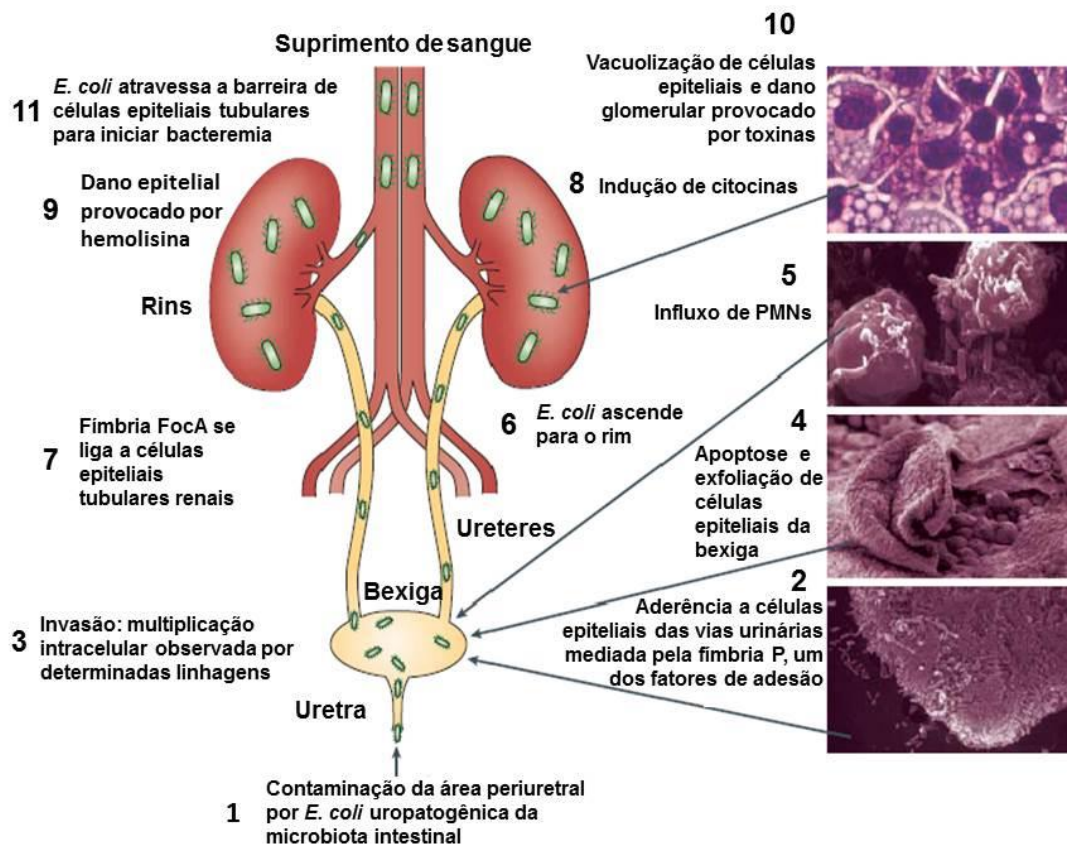


Figura 2 – Patogênese da infecção do trato urinário por *E. coli* uropatogênica.

Legendas: PMNs – Polimorfonucleares. Fonte: Adaptado de KAPER *et al.*, 2004

Entre os fatores de virulência associados à UPEC, a expressão de fatores de adesão, mesmo em meio à expressão de toxinas ou quaisquer outros fatores de virulência, é o mais importante determinante da patogenicidade, visto que a adesão de UPEC a células do trato urinário evita a depuração provocada pelo fluxo de urina. Fatores de adesão podem também contribuir para a virulência de várias outras formas, por exemplo, ao desencadear ativação de vias de sinalização das células do hospedeiro, podendo proporcionar o aumento da adesão bacteriana e a invasão das células hospedeiras (GUAY, 2008). Estudos têm demonstrado que *E. coli* é capaz de invadir e replicar dentro da mucosa da bexiga formando comunidades bacterianas intracelulares, o que pode estabelecer reservatórios intracelulares quiescentes para infecções recorrentes (ANDERSON *et al.*, 2004; MULVEY; SCHILLING; HULTGREN, 2001).

Além disso, fatores de adesão são os principais mediadores na formação inicial de biofilmes. Biofilmes são comunidades bacterianas, inseridas em uma matriz

extracelular impermeável que fornece proteção contra condições deletérias, como a ação de células imunes e uso de antibióticos. Diante destes fatos, é possível dizer que os biofilmes geram grande impacto clínico e são reconhecidos como responsáveis por grande parte das infecções crônicas e de difícil tratamento (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; BJARNSHOLT, 2013).

Nesse contexto, foi proposto um estudo de epidemiologia molecular focando na *Escherichia coli* associada à infecção do trato urinário no âmbito do Hospital Regional da Ceilândia (HRC), unidade de saúde hospitalar integrante da Secretaria de Saúde do Distrito Federal. A caracterização dos perfis genético e fenotípicos de *E. coli* associada a ITU é importante para o entendimento da patogênese e para manejo clínico dos quadros infecciosos. Ademais, o conhecimento dos perfis genéticos (genótipos) predominantes nas cepas de UPEC revela o potencial patogênico dos isolados e os possíveis quadros clínicos associados.

2. JUSTIFICATIVA

E. coli é a espécie bacteriana mais comumente isolada em laboratórios clínicos e pode ser incriminada como agente infeccioso de praticamente todos os tecidos e sistemas orgânicos dos seres humanos. Além de ser o agente etiológico principal das infecções comunitárias de trato urinário, é um dos agentes comumente envolvidos na sepse por microrganismos Gram-negativos e no choque tóxico induzido por endotoxinas. Em meio a esta gama de infecções, participam linhagens diferentes de *E. coli*, que exploram mecanismos de virulência diversos no intuito de estabelecer a colonização de sítios específicos do corpo humano.

O trato urinário é um dos locais mais comuns de infecção bacteriana. Embora muitos isolados de *E. coli* recuperadas de ITU pareçam ser clonais, não há um genótipo único responsável por infecções do trato urinário. Desse modo, estudos de epidemiologia molecular têm contribuído para o desenvolvimento de um modelo de patogênese de UPEC. Além disso, a determinação de um perfil genético e de virulência das cepas circulantes permite esclarecer quais os patotipos estão frequentemente associados a uma determinada condição, o que pode facilitar o entendimento e o manejo de quadros infecciosos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterização fenotípica e molecular de cepas patogênicas de *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário (ITU) no Hospital Regional de Ceilândia (HRC).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir os tipos patogênicos de *E. coli* associados a ITU;
- Caracterizar o perfil genético de cepas de *E. coli* que circulam no HRC;
- Avaliar a presença de genótipos potencialmente patogênicos associados à septicemia ou meningite;
- Identificar cepas heteropatogênicas de *E. coli*;
- Avaliar a formação de biofilme por cepas de UPEC.

4. METODOLOGIA

4.1. COMITÊ DE ÉTICA E FINANCIAMENTO

Este projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa FEPECS/SES-DF (número do parecer: 801.964) sob o título “Caracterização de cepas patogênicas de *Escherichia coli* isoladas no Hospital Regional de Ceilândia” e número de registro CAAE 34392214.0.0000.5553. O trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF) por meio a linha de fomento: 193.000.019/2012.

4.2. COLETA DAS AMOSTRAS E DADOS

A coleta das amostras foi realizada no Hospital Regional de Ceilândia (HRC) no Distrito Federal, no período de fevereiro a julho de 2014. Foram colecionadas para análise 78 cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de urina de pacientes admitidos no pronto-socorro ou internados, de ambos os sexos, com idades entre 0 a 91 anos. As culturas foram solicitadas e realizadas no Laboratório de Microbiologia do HRC para fins de diagnóstico por solicitação médica. Além disso, foram coletados dados acerca dos casos, tais como presença de elementos anormais na amostra de urina (leucócitos, hemácias e muco).

A seleção dos casos foi feita com base nos critérios para definição de infecção do trato urinário (ITU) estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009): paciente com sinais ou sintomas e cultura de urina positiva com contagem superior a 10^5 unidades formadoras de colônias por mL; ou paciente com sinais ou sintomas e alterações típicas de ITU no EAS ou diagnóstico de ITU pelo médico ou uso de terapia apropriada para ITU instituída pelo médico.

Os isolados de *Escherichia coli* recuperados no HRC foram preservados em meio de cultura (ágar nutriente) e encaminhados aos laboratórios da Faculdade de Ceilândia (FCE/UnB), onde foram realizados estudos de caracterização molecular e fenotípica.

4.3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

A identificação dos isolados de *E. coli* foi realizada no Hospital Regional de Ceilândia (HRC) utilizando o sistema automatizado MicroScan WalkAway®, que explora microplacas (painéis) de 96 poços, impregnados com a série bioquímica para identificação bacteriana. Para tanto, foi realizado o processo a ser descrito. Em cada placa de urocultura foi selecionada uma colônias de *E. coli* para a solubilização em solução salina estéril 0,4% (p/v) com agente emulsificante, até alcançar turbidez adequada. Dessa forma, a suspensão de células em solução salina foi diluída em caldo de inóculo específico para o equipamento. O inóculo foi utilizado para preencher os painéis de identificação. Estes foram incubados a 35° C, no máximo por 15 horas antes da leitura final. O perfil de identificação foi interpretado pelo *software* por meio da comparação a um banco de dados, que fornece o resultado e o nível de precisão da identificação.

4.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As culturas mantidas em ágar nutriente foram recuperadas em caldo LB, incubando-se a 37°C por 24 horas. Para extração do DNA, foi centrifugado (3.000 RCF/3 min) 1 mL de cultura bacteriana e o precipitado celular ressuspenso em 500 µL de água deionizada. A suspensão foi colocada em banho-maria a 100 °C por 15 minutos e centrifugada (9.000 rpm/3 min). O sobrenadante foi utilizado como fonte de DNA total para as reações de amplificação. A solução de amplificação era composta por água deionizada, tampão de PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 a 25 ° C; KCl 500 mM; 0,01% de gelatina), desoxinucleotídeos trifosfatos 25 mM, pares de *primers* de interesse (Tabela 2) e enzima Taq DNA polimerase 0,5 U, em um volume final de 30µL. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1% tampão acetato pH 8,2) e visualizados por transiluminação de luz UV após coloração com brometo de etídio.

Primers (descritos na tabela abaixo) foram usados para detecção de fatores de virulência (toxinas e adesinas) albergados por diferentes patótipos de *E. coli*. As cepas de *E. coli* destinadas como controles positivos das reações foram: 042 (*aat*, *aggR*, *agn43*, *csgA*, *pic* e *pet*), FV34 ou FVL2 (*papC*, *sfaD-E*, *focA*, *cnf*, *vat*, *fyuA*,

chuA e *yfcV*), EHEC 933 (*hlyA*) e 220-1 ou 220-4 (*pilS*). Para controle negativo, foi utilizada a cepa *E. coli* HS.

Tabela 2 – Primers utilizados para detecção dos fatores de virulência.

Gene	Descrição do locus	Seqüência dos primers (5'-3')	Fragmento esperado (pb)	Temp. de anelamento (°C)
<i>ag43</i>	Antígeno 43 (adesina)	CGATCGATAAGCTAATAATAACC GAAGACCACCACTGGTGACA	552	55
<i>csgA</i>	curli	ACTCGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	200	50
Marcadores de <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)				
<i>pCVD</i>	Sonda pAA	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CCATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	55-60
<i>aggR</i>	Ativador transcricional	CTAATTGTACAATCGATGTA CTGAAGTAATTCTTGAAT	324	50
<i>pilS</i>	<i>Pilus</i> tipo IV	ATGAGCGTCATAACCTGTTC CTGTTGGTTTCCAGTTTGAT	532	58
<i>pic</i>	Mucinase	TTCAGCGGAAAGACGAA TCTGCGCATTACACCA	500	55-60
<i>pet</i>	Toxina codificada or plasmídeo	CCGCAAATGGAGCTGCAAC CGAGTTTTCCGCCGTTTTTC	1.133	55-60
Marcadores de <i>E. coli</i> associada a meningite neonatal (MNEC)				
<i>cnf</i>	Fator necrosante citotóxico	GTGAAGCTCAACGAGACTAT TCAGTAGCTCCTCTCATCAA	806	53
<i>sfa</i>	Fímbria S	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	407	60
Marcadores de <i>E. coli</i> uropatogênica (UPEC)				
<i>focA</i>	Fímbria F1C	GAAAGTAGATGGAGCTAAAAGCAAT CATGACATGCCAGTGGTTTC	472	54
<i>papC</i>	<i>Pilus</i> P	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328	60
<i>vat</i>	Toxina vacuolizante	CAGAACATTTGCTCCCTTGT ACACGTTCCAGGATTCAGT	978	53
<i>fyuA</i>	Receptor de sideróforo	TGAGTGGGAAATACACCACC TTACCCGATTGCTTGCTTAATGTC	725	54
<i>chuA</i>	Proteína ligadora de grupo heme	TAACTGTCATAGCGGGTTCC AGTCTCTGAGCGGTTTAGTG	439	55
<i>yfcV</i>	Gene do operon da fímbria YFC	ATCCGTGTTGGCTGGC GGTCATGGGCGCAGTT	244	54
Marcadores de <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)				
<i>hlyA</i>	Hemolisina	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	1.551	57

4.5. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

4.5.1 COLETA DE AMOSTRAS DE URINA

Para tanto, foram coletadas 15 amostras de urinas de jato médio em recipientes estéreis (tubos cônicos de 50 mL) por micção espontânea de indivíduos assintomáticos e sem registro de uso de antibióticos nas duas semanas anteriores. Os voluntários foram devidamente informados quanto ao objetivo da pesquisa e à utilização da amostra e atestaram consentimento por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Eles formaram um grupo heterogêneo de homens e mulheres (em uso ou não de anticoncepcional), gestantes e crianças, selecionados intencionalmente, no intuito de demonstrar diferentes comportamentos das cepas bacterianas em diferentes tipos de urina. As urinas coletadas foram submetidas à esterilização por filtração (0,22 µm) e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

4.5.2. FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Para os ensaios de formação de biofilme, amostras de urina humana foram utilizadas como meio para crescimento bacteriano, mimetizando condições reais de colonização do trato urinário. Foram escolhidas 15 cepas de *E. coli* apresentando genótipos frequentemente detectados. A formação de biofilme foi avaliada com base no método descrito por Wakimoto *et al.* (2004) empregando placas de poliestireno contendo 96 poços (WAKIMOTO *et al.*, 2004). Concisamente, 200 µL de urina por poço foram inoculados com 5 µL de cultura bacteriana. As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C e os biofilmes formados foram corados com cristal violeta (CV) por 15 minutos e lavados com D-PBS (200 µL/poço). Os biofilmes foram quantificados utilizando a média do CV adsorvido (OD 630 nm) no fundo do poço somado ao CV solubilizado por etanol (200 µL/poço). O ensaio foi realizado em triplicata. Nele, foram utilizados como controles as cepas 042 (diarreiogênica) e FVL2 (uropatogênica).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados categóricos, como a frequência de genes de virulência, foram analisados por meio do teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, observadas as limitações dos testes em relação às amostras analisadas. Dados paramétricos foram analisados utilizando o teste T de Student, ou o teste de Mann-Whitney, para casos em que os dados não possuíam uma distribuição normal ou a análise de variância demonstrava heterocedasticidade entre as populações comparadas. Resultados com valor de p menor ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Setenta e oito cepas de *E. coli* foram isoladas de infecção urinária (ITU) e foram, portanto, consideradas cepas de *E. coli* uropatogênicas (UPEC). Dessas, 62 cepas foram isoladas de pacientes atendidos no pronto-socorro, sendo a maioria deles (45/62 – 72,6%) do gênero feminino (Tabela 3). Dezesesseis pacientes internados, igualmente distribuídos em relação ao gênero, foram diagnosticados com ITU. Apesar do exame de Elementos Anormais do Sedimento urinário (EAS) ser um exame complementar ao diagnóstico de ITU, nem todos os pacientes submetidos à urocultura realizaram o EAS, conforme mostrado na Tabela 03. Todas as uroculturas tiveram contagem maior que 10⁵ UFC/mL, com exceção de duas, nas quais a contagem foi de 60.000 UFC/mL, ambas recuperadas de pacientes do pronto-socorro. Apesar disso, essas pessoas apresentavam manifestações clínicas de ITU e EAS com alterações importantes e, portanto, foram incluídas na análise.

Tabela 03 – Características associadas aos casos de ITU detectados no HRC.

	Nº (%)	Pronto-Socorro (%)	Internação (%)
nº de paciente	78 (100)	62 (100)	16 (100)
Gênero			
<i>F</i>	53 (67,9)	45(72,6)	8 (50)
<i>M</i>	25 (32,1)	17 (27,4)	8 (50)
Idade média (±SEM)		31,1±3,7	30,8±7,7
EAS realizado		39 (62,9)	5 (31,3)
Elementos figurados			
Leucócitos/campo			
	≤3	2	-
	4-10	5	1
	11-40	6	-
	Numerosos	26	4

O gráfico 1 apresenta a distribuição etária dos casos de ITU no HRC em relação à área de atendimento, internação ou pronto-socorro. O gráfico 1 demonstra que a amostra encontra-se amplamente variada no que se refere à idade dos pacientes. Observa-se um maior número de pacientes nos grupos etários considerados de risco, crianças e idosos. As crianças (≤ 15 anos) encontram-se inseridas em sua maior parte no atendimento de urgência -pronto-socorro- (26/31; 83,8%), bem como os pacientes com idade superior a 50 anos (16/26 – 61,5%). Dos casos de ITU em internação (n = 16), a maioria acometeu pacientes com idade superior a 50 anos (10/16; 62,5%). A vulnerabilidade desse grupo etário à ITU é aumentada quando estão internados, devido, principalmente, à baixa tolerância aos

procedimentos terapêuticos e ao elevado tempo de hospitalização, o que acarreta no uso prolongado de dispositivos invasivos (STAPLETON, 2014).

Fora do ambiente hospitalar, os casos de ITU são mais frequentes em mulheres do que em homens (FOXMAN *et al.*, 2002; STAPLETON, 2014). No entanto, essa relação pode ser alterada em determinadas faixa etárias. O gráfico 1 também apresenta a distribuição de gênero em relação à idade dos pacientes admitidos no pronto-socorro, considerados aqui como pacientes com ITU comunitária. O gráfico demonstra um equilíbrio entre pacientes masculinos e femininos com idade menor do que 1 ano. Dados epidemiológicos mostram que, frequentemente, os recém-nascidos masculinos são igualmente afetados por ITU quando comparados aos do gênero feminino, principalmente até os 3 meses de vida (KOCH & ZUCCOLOTTO, 2003). No entanto, essa situação se inverte após essa faixa etária, com predomínio do gênero feminino e se mantém assim durante todo o período da vida adulta jovem, no qual a mulher, além de mais susceptível devido à estrutura anatômica do trato urinário, é exposta a fatores de risco, como o início da vida sexual e a gravidez (JIDO, 2014). Nossos dados também corroboram estas observações universais, visto que, ao estratificar a amostra na faixa etária de 2 a 49 anos, aproximadamente 82% dos pacientes são do gênero feminino (Gráfico 1). Com o avanço da idade, a incidência de ITU em relação ao gênero se equilibra novamente, em virtude de afecções que afligem ambos os gêneros, tais como: bexiga neurogênica e “bexiga caída”, que aumentam o volume residual de urina, e diminuição da resposta imune celular (KOCH & ZUCCOLOTTO, 2003; MALIK; COHN; BALES, 2014; STAPLETON, 2014). Os resultados mostram que, ao selecionar os pacientes acima de 50 anos, a proporção do gênero masculino (8/16 - 50%) e feminino (8/16 - 50%) está em igualdade para os pacientes atendidos no pronto-socorro (Gráfico 1).

Dados epidemiológicos destacam que 35 a 45% de todas as infecções hospitalares adquiridas são do trato urinário, e que 80% estão associadas ao uso do cateter vesical de demora (QUEIROS *et al.*, 2011; STAMM, 1991). Tendo em vista que o uso desse dispositivo é feito igualmente em ambos os gêneros, é possível prever que, em relação aos pacientes internados, não haveria uma predominância de um dos sexos nos casos de ITU nosocomiais, conforme mostrado na gráfico 1.

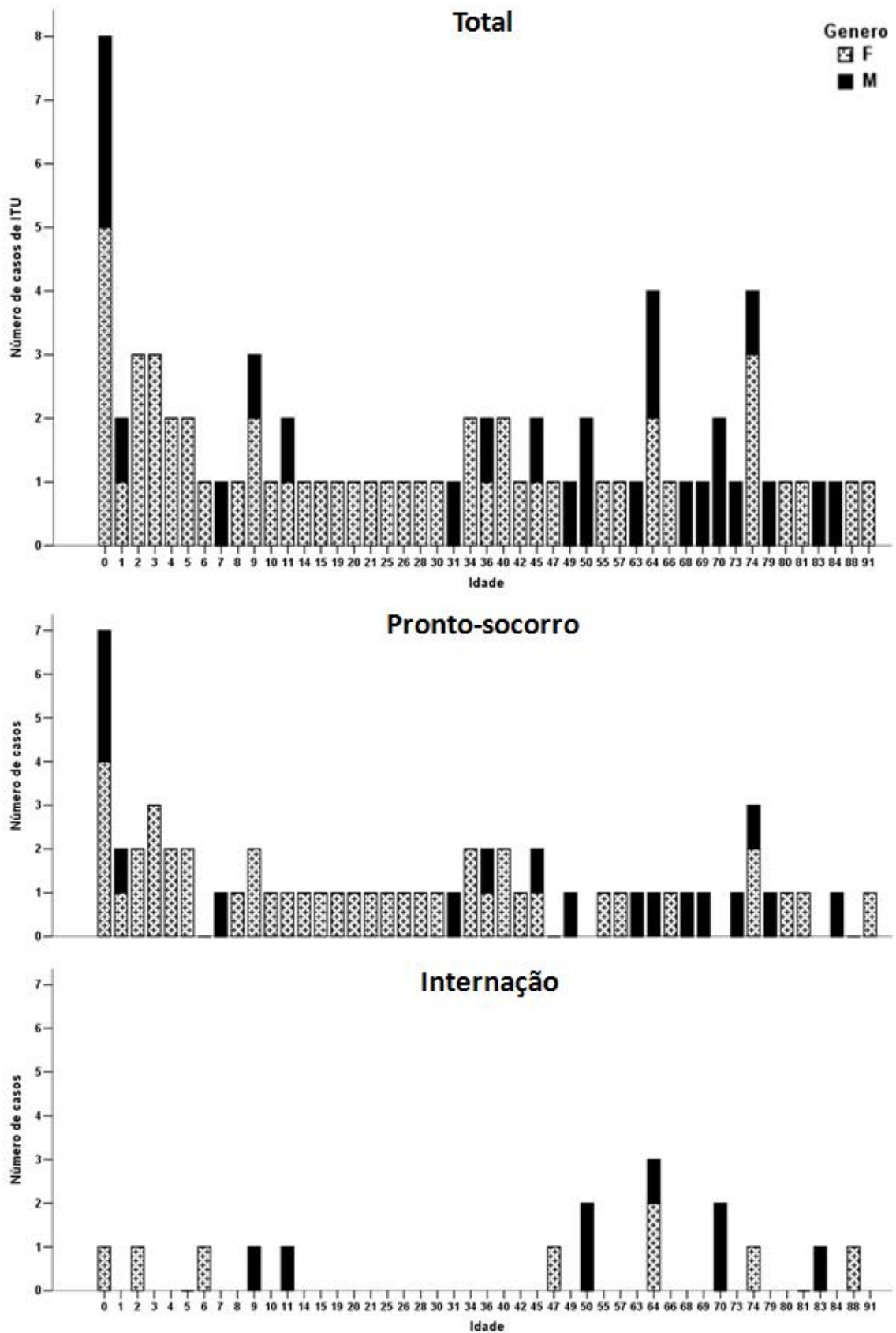


Gráfico 1 – Distribuição etária e área de atendimento dos casos de ITU atendidos no HRC

Estudos de epidemiologia molecular demonstram que cepas de UPEC expressam variados fatores de virulência (JOHNSON & RUSSO, 2005; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). Com relação ao potencial dessas cepas, a tabela 4 mostra a frequência dos fatores de virulência detectados em relação à área de atendimento. Além dos genes de virulência característicos de UPEC, foi detectado também a presença de genes associados a patótipos de *E. coli*, causadores de meningites (MNEC) e diarreia (EAEC) nas cepas isoladas de ITU (Tabela 4).

Dos 16 genes virulência pesquisados, 14 foram encontrados nas cepas analisadas apresentando frequências variadas. Dentre os fatores analisados, os mais frequentes foram *chuA* (78,2%), *csgA* (76,9%) e *fyuA* (69,2%). Os genes de virulência associados a cepas de MNEC *cnf* e *sfa* foram detectados em 23 e 12% das cepas de UPEC analisadas, respectivamente, enquanto que fatores de virulência de EAEC (*pCVD* e *aggR*) foram detectados em 5% das cepas. Os marcadores *hlyA* (EHEC) e *pet* não foram detectados nas amostras analisadas (Tabela 4).

A expressão de sistemas de aquisição de ferro (sideróforos) como *chuA* (proteína ligadora de grupo heme) e *fyuA* (receptor sideróforo) é essencial para a colonização e persistência de bactérias no trato urinário, visto que nele operam processos que sequestram e limitam a disponibilidade de ferro e funcionam como mecanismo de defesa do hospedeiro (NAGY *et al.*, 2001). Nesse contexto, é esperado uma alta prevalência desses genes nas cepas de UPEC analisadas (Tabela 4). A aquisição de ferro tem um papel importante na sobrevivência bacteriana e na patogenicidade e este fato pode ser demonstrado pela existência de vários sistemas diferentes de aquisição de ferro que são expressos em cepas de UPEC, como *ireA*, *iroN*, *fyuA* e *chuA* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SNYDER *et al.*, 2004). Além do mais, modelos de infecção *in vivo* têm mostrado que, na ausência destes sistemas, cepas de UPEC são facilmente superadas por aquelas da microbiota normal (TORRES *et al.*, 2001).

Outro gene de virulência frequentemente detectado em nossa coleção foi *csgA* (76,9%), que codifica a fímbria amiloide conhecida por curli. Fímbria curli é um importante fator de virulência e está envolvido na agregação bacteriana; na adesão a uma série de proteínas do hospedeiro, incluindo proteínas de matriz extracelular;

na formação de biofilmes, e na ativação do sistema imune inato (KIKUCHI *et al.*, 2005; OLSEN; JONSSON; NORMARK, 1989; TUKEL *et al.*, 2009). Dados da literatura demonstram que curli é expresso por cerca de 50% dos isolados de *E. coli* de infecção urinária (EMODY; KERENYI; NAGY, 2003). Em parte das cepas, a expressão de curli é ótima a temperatura ambiente, o que permite a colonização da região perianal, tendo em vista que a temperatura corporal periférica é geralmente, inferior a 36° C (EMODY; KERENYI; NAGY, 2003). O padrão de microbiota da região perianal é considerado um fator que predispõe infecções subsequentes, uma vez que grande parte das ITU se dá pela contaminação do trato urinário decorrente da transferência de microrganismos da microbiota intestinal e perianal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Estudos epidemiológicos sobre virulência de UPEC mostram que a frequência de *pap* (fímbria P) pode apresentar grandes variações com relatos de 0 a 54% para a ocorrência deste gene entre as cepas de UPEC (BLANCO *et al.*, 1997; TAKAHASHI *et al.*, 2006). Neste estudo, *pap* foi detectado em 47% das cepas. Há uma correlação entre a presença de *pap* e a severidade dos casos de ITU. Este fato é endossado pelo aumento da prevalência de *pap* em isolados de infecções mais graves. Estudos epidemiológicos mostram que a frequência de *pap* é de 10 a 20% em cepas de *E. coli* recuperadas da microbiota fecal, de 50 a 60% em cepas causadoras de cistite, e de 70 a 100% em cepas isoladas de casos de pielonefrite (MORENO *et al.*, 2008; SVENSON *et al.*, 1983). A fímbria P é o fator de adesão mais importante e mais estudado de UPEC, uma vez que permite a colonização da bexiga bem como das vias urinárias superiores. Em nosso estudo, *pap* foi detectado com uma frequência maior nas cepas isoladas de casos de ITU atendidos no pronto-socorro (53%) quando comparados aos casos em pacientes internados (25%) ($p=0,0053$).

Pensa-se que casos de ITU comunitária são causados por cepas que possuem a capacidade de alcançar o trato genito-urinário e ascender ativamente pelas vias urinárias explorando mecanismos de adesão, como a fímbria P. Já as infecções urinárias hospitalares, estão geralmente associadas ao uso de dispositivos invasivos, como os cateteres. Estes dispositivos funcionam como carreadores de microrganismos facilitando a colonização do trato urinário por cepas menos especializadas no que tange a virulência (STAMM, 1991).

Dentre as cepas de *E. coli* capazes de causar infecções extraintestinais estão aquelas associadas a meningite infantil (MNEC). Cepas de MNEC são caracterizadas pela alta capacidade de dispersão hematogênica e de transposição da barreira hematoencefálica que estão potencialmente associadas à presença dos genes *cnf* e *sfa* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Os genes *cnf* e *sfa* são, portanto, considerados preditores para infecção de meninge e foram detectados, respectivamente, em 23 e 12% das cepas de UPEC neste estudo.

Estudos epidemiológicos sobre cepas de UPEC têm demonstrado que fatores de virulência de categorias diarreiogênica de *E. coli*, sobretudo de EAEC, podem ser detectados nessas cepas (ABE *et al.*, 2008; CHATTAWAY *et al.*, 2014). Em um estudo sobre cepas de UPEC isoladas em um hospital de São Paulo, foi demonstrado que 7% das cepas isoladas carregavam pelo menos algum gene de virulência de EAEC, com 3% delas positivas para *pCVD* e *aggR*. Estudos internacionais têm mostrado percentual semelhante de 3% para a ocorrência de *aggR* em cepas de UPEC. Nossos resultados revelam que 5% das cepas de UPEC portam genes de virulência de EAEC, *pCVD* ou *aggR* (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência dos fatores de virulência em cepas de UPEC isoladas de pacientes atendidos no pronto-socorro ou internados.

Fator de virulência	Nº cepas testadas	Positividade (%)	Positividade (%) INTER X PS	p*	Patotipo associado
<i>chuA</i>	78	78,2	62,5 vs 82,3	0,101	UPEC
<i>csgA</i>	78	76,9	62,5 vs 80,6	0,181	Vários
<i>fyuA</i>	78	69,2	50,0 vs 74,2	0,075	UPEC
<i>pap</i>	78	47,4	25,0 vs 53,2	0,053	UPEC
<i>yfcV</i>	78	39,7	31,3 vs 41,9	0,570	UPEC
<i>vat</i>	78	32,1	18,8 vs 35,5	0,244	UPEC
<i>cnf</i>	78	23,1	24,2 vs 18,8	0,751	MNEC
<i>focA</i>	78	12,8	12,5 vs 12,9	1,00	UPEC
<i>sfa</i>	78	12,8	18,8 vs 11,3	0,420	MNEC/UPEC
<i>ag43</i>	78	10,3	6,3 vs 11,3	1,00	Vários
<i>pic</i>	78	7,7	6,3 vs 8,1	1,00	EAEC/UPEC
<i>pCVD</i>	78	5,1	6,3 vs 4,8	1,00	EAEC
<i>aggR</i>	78	5,1	6,3 vs 4,8	1,00	EAEC
<i>pilS</i>	78	5,1	6,3 vs 4,8	1,00	Vários
<i>pet</i>	78	0	-	-	EAEC
<i>hlyA</i>	78	0	-	-	EHEC

* Teste Exato de Fisher para a comparação entre os dois grupos. Legendas: INTER – Internação; PS – Pronto-socorro.

A tabela 5 mostra a distribuição dos genes de virulência em relação à faixa etária dos pacientes com ITU. Uma das cepas de UPEC não foi incluída na análise em virtude da ausência de informação acerca da idade do paciente. Com relação aos fatores de virulência, foi demonstrado que os genes *chuA*, *csgA*, *fyuA*, *pap* e *sfa* são mais frequentes em cepas isoladas de pacientes menores de 15 anos, apresentando associação estatisticamente significativa com esta faixa etária ($p < 0,05$) (Tabela 5). O gene *pilS* também mostrou associação significativa, mas apenas em relação às cepas isoladas de pacientes da faixa etária de 3 a 15 anos ($p = 0,039$).

Em nosso estudo, dos 5 genes de virulência estatisticamente associados a infecções em crianças, 3 são fatores de adesão incluindo *pap* e *sfa* (fímbria P e S, respectivamente). Fatores de adesão expressos por cepas de UPEC ligam-se a receptores específicos em células epiteliais, em geral, receptores que têm como motivos dímeros de galactose como Gal-Gal (fímbria P) ou GalNAc-GalNAc (fímbria F1C/fímbria S) (ENERBACK *et al.*, 1987; PARKKINEN *et al.*, 1986). As crianças representam um grupo etário com maior risco associado à infecção do trato urinário, especialmente infecções complicadas como pielonefrites (BHAT; KATY; PLACE, 2011), e alguns trabalhos têm demonstrado a associação de cepas altamente virulentas com infecções neonatais (BINGEN *et al.*, 1998). Uma possível explicação para estas associações pode estar relacionada à diferença de expressão de receptores celulares em adultos e crianças. Este fato já foi demonstrado para os receptores DAF (CD55) que tem nível de expressão diferenciado em decorrência da idade e são reconhecidos por adesinas Afa/Dr expressas por *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (MANSAN-ALMEIDA; PEREIRA; GIUGLIANO, 2013; WAITUMBI *et al.*, 2004). Infelizmente, apesar de nossos esforços, não foram encontrados estudos que permitissem comprovar associações semelhantes para as fímbrias P e S.

Tabela 5 – Frequência dos fatores de virulência em cepas de UPEC isoladas de diferentes faixas etárias.

Fator de virulência	N° cepas testadas	Positividade Geral	POSITIVIDADE POR FAIXA ETÁRIA				Teste exato de Fisher (p)
			0 a 2 (n = 13)	3 a 15 (n = 19)	16 a 50 (n = 21)	Acima de 50 (n = 24)	
<i>chuA</i>	77	79,2%	100%	94,7	61,9%	70,8%	0,008
<i>csgA</i>	77	79,2%	100%	100%	61,9%	66,7%	0,001
<i>fyuA</i>	77	71,4%	100%	84,2%	52,4%	62,5%	0,006
<i>pap</i>	77	49,4%	76,9%	78,9%	28,6%	29,2%	< 0,001
<i>yfcV</i>	77	41,6%	69,2%	26,3%	42,9%	37,%	0,111
<i>cnf</i>	77	24,7%	38,5%	26,3%	10,5%	36,8%	0,212
<i>vat</i>	77	33,8%	46,2%	36,8%	23,8%	33,3%	0,580
<i>focA</i>	77	13,0%	15,4%	15,8%	9,5%	12,5%	0,936
<i>pic</i>	77	7,8%	23,1%	5,3%	4,8%	4,2%	0,242
<i>sfa</i>	77	14,3%	30,8%	21,1%	0%	12,5%	0,037
<i>ag43</i>	77	10,4%	7,7%	21,1%	4,8%	8,3%	0,435
<i>pCVD</i>	77	5,2%	7,7%	5,3%	0%	8,3%	0,637
<i>aggR</i>	77	5,2%	7,7%	5,3%	0%	8,3%	0,637
<i>pilS</i>	77	5,2%	7,7%	15,8%	0%	0%	0,039
<i>pet</i>	77	0%	0%	0%	0%	0%	-
<i>hlyA</i>	77	0%	0%	0%	0%	0%	-

Em relação aos fatores de virulência, alguns patótipos de *E. coli* são marcados pela heterogeneidade suportada por linhagens com alta plasticidade genética. Neste cenário, a coleção de fatores de virulência em cepas do mesmo patótipo pode variar. O gráfico 2 demonstra o número de genes de virulência (carga de virulência) das cepas isoladas por faixa etária. Observa-se que as cepas isoladas de pacientes mais jovens tendem a apresentar maior carga de virulência quando comparadas às de adultos. Ressalta-se que as cepas mais virulentas, apresentando 9, 10 ou 11 fatores de virulência, foram isoladas exclusivamente de pacientes menores de 15 anos. Em oposição, cepas com 1, 2 ou negativas para os fatores de virulência foram isoladas exclusivamente de pacientes adultos (Gráfico 2).

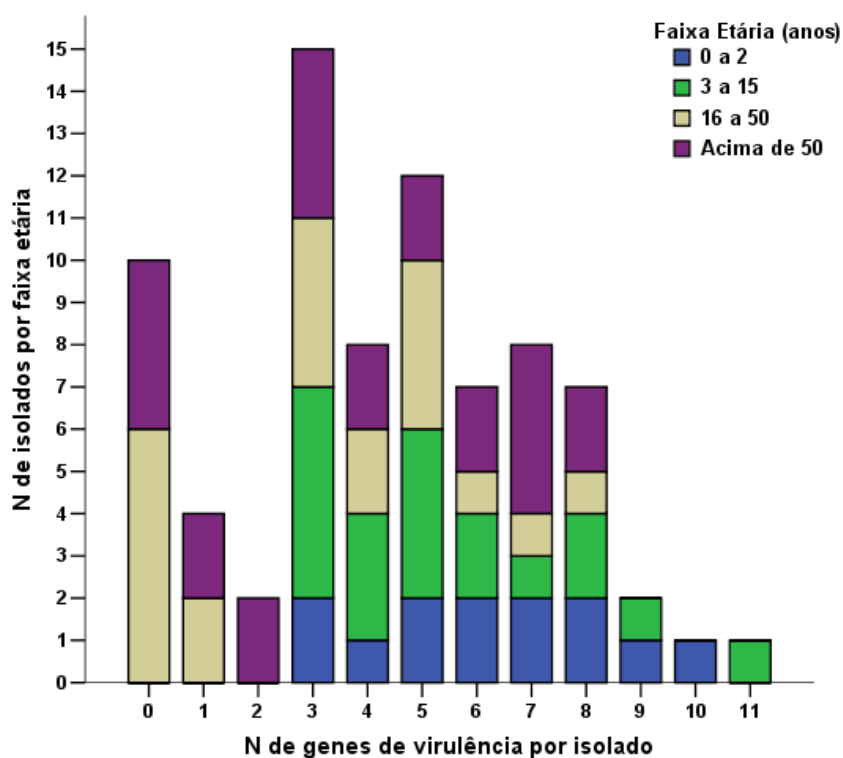


Gráfico 2 – Número de genes de virulência em cepas de UPEC recuperadas de diferentes faixas etárias.

Para fins de análise estatística, optou-se pelo cálculo da média de genes de virulência por cepas de UPEC isoladas nas diferentes faixas etárias (Gráfico 2). Dessa forma, observou-se que a média dos fatores de virulência nas cepas isoladas de pacientes de 0 a 2 anos foi de 6,2 genes/cepa; para os de 3 a 15 anos, a média foi de 5,3 genes/cepa, e para as cepas isoladas de pacientes de 16 a 50 foram detectados 3 genes/cepa em média. Os dados demonstram uma diferença significativa ($p \leq 0,01$) na carga de virulência das cepas isoladas nos menores de 15 anos quando comparadas àquelas da faixa etária de 16 a 50 anos (Gráfico 3). O fato de que cepas de patotipos de *E. coli* isoladas de crianças carregam uma carga de virulência maior quando comparadas as de adultos tem sido reportado por outros trabalhos. Em um estudo epidemiológico recente, também conduzido em Brasília, foi mostrado que cepas de *E. coli* diarreio gênicas isoladas de crianças apresentavam genes de virulência em frequência superior àquelas isoladas de adultos (MANSAN-ALMEIDA; PEREIRA; GIUGLIANO, 2013).

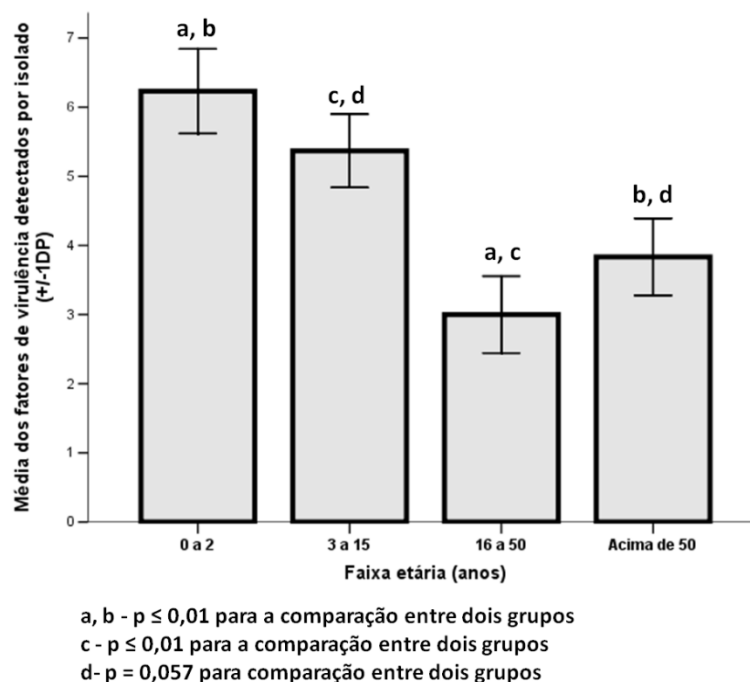


Gráfico 3 – Carga de virulência* em cepas de UPEC isoladas de pacientes em diferentes faixas etárias. *Média de genes de virulência por cepa.

Para avaliar se alterações nos elementos figurados da urina associam-se à presença de genes de virulência detectados, a frequência dos genes foi analisada em função dos parâmetros demonstrados nos ensaios de EAS (Tabela 6). Assim, foi possível observar que os genes *pap* e *focA* estão estatisticamente associados ($p \leq 0,05$) à presença de muco na urina. Com relação à *pap*, 70,8% das cepas positivas foram isoladas de amostras de urina apresentando muco (1+ ou 2+); enquanto que, 72,2% das cepas com resultados negativos para *pap* foram recuperadas de amostras de urina sem a presença de muco. Para *focA*, 80% das cepas positivas foram isoladas de urina com presença de muco (1+), ao passo que 51,4% das cepas negativas foram isoladas de amostras de urina sem muco. Sobre a superfície das mucosas, a camada de muco age primariamente como barreira de proteção evitando que microrganismos contatem intimamente a superfície celular impedindo, assim, a interação dos fatores de adesão bacterianos com receptores nas células epiteliais (CORNISH; VANDERWEE; MILLER, 1987). É resposta comum às mucosas, o aumento na expressão de muco diante de processos de colonização por microrganismos patogênicos (CORNISH; VANDERWEE; MILLER, 1987).

Nota-se também que todas as cepas positivas para *pic* foram isoladas de amostras de urina sem a presença de sangue. Em contrapartida, 73% das cepas negativas para *pic* foram estatisticamente associadas à hematúria ($p = 0,021$). Apesar do nosso empenho, não dispomos de explicações biológicas que endossem tal fato.

Tabela 6 – Distribuição da frequência dos fatores virulência de UPEC em função das alterações visualizadas no EAS

Casos		ELEMENTOS FIGURADOS EM URINA											
		Presença de Muco				Leucócitos por campo				Hemácias por campo			
		Escasso	1+	2+	P	< 3 (Raros)	4 a 40	> 40 (Num.)	P	Aus.	< 3 (Raros)	4 a Num.	P
<i>chuA</i>	Pos	42,4	30,3	27,3	0,213	6,1	12,1	81,8	0,756	34,8	13,0	52,2	0,538
	Neg	66,7	33,3	0		0	22,2	77,8		42,9	28,6	28,6	
<i>csgA</i>	Pos	42,9	31,4	25,7	0,234	5,7	11,4	82,9	0,501	40,0	12,0	48,0	0,280
	Neg	71,4	28,6	0		0	28,6	71,4		20,0	40,0	40,0	
<i>fyuA</i>	Pos	38,7	35,5	25,8	0,220	6,5	16,1	77,4	1,00	27,3	13,6	59,1	0,064
	Neg	72,7	18,2	9,1		0	9,1	90,9		62,5	25,0	12,5	
<i>pap</i>	Pos	29,2	33,3	37,5	0,003	4,2	4,2	91,7	0,068	23,5	11,8	64,7	0,084
	Neg	72,2	27,8	0		5,6	27,8	66,7		53,8	23,1	23,1	
<i>yfcV</i>	Pos	46,7	33,3	20,0	1,00	6,7	6,7	86,7	0,576	55,6	0	44,4	0,215
	Neg	48,1	29,6	22,2		3,7	18,5	77,8		28,6	23,8	47,6	
<i>cnf</i>	Pos	50,0	25,0	25,0	1,00	12,5	12,5	25,0	0,402	50,0	0	50,0	1,00
	Neg	47,1	32,4	20,6		2,9	14,7	82,4		34,6	19,2	46,2	
<i>vat</i>	Pos	35,7	42,9	21,4	0,434	0	21,4	78,6	0,558	40,0	0	60,0	0,268
	Neg	53,6	25,0	21,4		7,1	10,7	82,1		35,0	25,0	40,0	
<i>focA</i>	Pos	20,0	80,0	0	0,051	0	20,0	80,0	1,00	50,0	0	50,0	1,00
	Neg	51,4	24,3	24,3		5,4	13,5	81,1		34,6	19,2	46,2	
<i>pic</i>	Pos	75,0	25,0	0	0,801	0	25,0	75,0	0,586	100	0	0	0,021
	Neg	44,7	31,6	23,7		5,3	13,2	81,6		26,9	19,2	53,8	
<i>sfa</i>	Pos	75,0	25,0	0	0,801	0	25,0	75,0	0,586	100	0	0	0,276
	Neg	44,7	31,6	23,7		5,3	13,2	81,6		32,1	17,9	50,0	
<i>ag43</i>	Pos	20,0	60,0	20,0	0,273	0	20,0	80,0	1,00	0	25,0	75,0	0,264
	Neg	51,4	27,0	21,6		5,4	13,5	81,1		42,3	15,4	42,3	
<i>pCVD</i>	Pos	33,3	33,3	33,3	0,785	0	33,3	66,7	0,479	33,3	0	66,7	1,00
	Neg	48,7	30,8	20,5		5,1	12,8	82,1		37,0	18,5	44,4	
<i>aggR</i>	Pos	33,3	33,3	33,3	0,785	0	33,3	66,7	0,479	33,3	0	66,7	1,00
	Neg	48,7	30,8	20,5		5,1	12,8	82,1		37,0	18,5	44,4	
<i>pilS</i>	Pos	50,0	50,0	0	1,00	0	0	100	1,00	0	100	0	0,167
	Neg	47,5	30,0	22,5		5,0	15,0	80,0		37,9	13,8	48,3	

A caracterização genética das 78 cepas revelou a presença de 40 genótipos diferentes. Onze das cepas (14,1%) não tiveram genótipo determinado. Os genótipos mais frequentemente detectados nas cepas de UPEC foram *fyuA chuA csgA* ($n = 7$), *fyuA chuA pap csgA* ($n = 4$) e *fyuA yfcV chuA pap csgA* ($n = 4$) (Tabela 6). Um estudo sobre predição genética de cepas de UPEC realizado com 29 genes demonstrou que a combinação *fyuA*, *yfcV* e *chuA* é a que possuía melhor valor preditivo para identificação de cepas de UPEC (SPURBECK *et al.*, 2012). Alternativamente, os autores mostraram que a combinação *fyuA* com qualquer um

dos outros dois genes (*yfcV* ou *chuA*) já apresentaria boa eficácia para a predição de UPEC. Em nossa coleção, a combinação dos genes *fyuA*, *yfcV* e *chuA* foi encontrada em 31 cepas (39,7%) compondo 19 genótipos diferentes (Tabela 7). Os genótipos contendo os genes *fyuA* e *chuA*, na ausência de *yfcV*, foram detectados em 23 cepas (29,4%), compondo 12 genótipos diferentes (Tabela 7). Genótipos contemplando a combinação *fyuA* e *yfcV* não foram detectados na nossa coleção. Adotando as predições estabelecidas, 69,1% das cepas foram molecularmente classificadas como potencialmente uropatogênicas.

Preditores genéticos de outras categorias patogênicas (MNEC e EAEC) foram encontrados entre as cepas de nossa coleção. Preditores genéticos de MNEC (*sfa* e *cnf*) foram detectados em 8 cepas (10,2%) compondo 6 genótipos diferentes. Estes genótipos apresentavam também a combinação *fyuA yfcV chuA* e foram, por consequência, descritos como cepas de UPEC com potencial de virulência para causar meningites (UPEC/MNEC). Além disso, marcadores genéticos da categoria diarreiogênica EAEC (*pCVD* e *aggR*) foram detectados em 4 cepas. Em 2 das cepas positivas para *pCVD* e *aggR*, o genótipo também apresentava combinações preditoras de UPEC (*fyuA yfcV chuA* ou *fyuA chuA*) e foram, então, caracterizadas como tendo um genótipo híbrido, UPEC/EAEC (Tabela 7). Por apresentar *fyuA* associado aos genes *pap* (*pilus* associado a pielonefrite) e *focA*, uma das cepas positivas para *pCVD* e *aggR* também foi considerada heteropatogênica (UPEC/EAEC).

Cepas de EAEC isoladas de infecção urinária têm sido reportadas por outros estudos de epidemiologia molecular (ABE *et al.*, 2008; CHATTAWAY *et al.*, 2014). Em um estudo realizado no Brasil, foi demonstrado que 3% das cepas isoladas de ITU eram positivas para *pCVD* (nominado *aatA*) e *aggR*. Semelhante aos nossos dados, os autores mostraram o mosaicismo genético ao revelar que alguns genótipos eram compostos por genes de EAEC e de UPEC (*pap*) (ABE *et al.*, 2008). Estes achados demonstram que linhagens fecais de EAEC podem apresentar potencial uropatogênico. Ademais, os dados levantam a possibilidade de as características de EAEC poderem ser transferidas para e estavelmente mantidas por cepas de UPEC, levando à emergência de categorias heteropatogênicas (BIELASZEWSKA *et al.*, 2014).

Tabela 7 – Genótipos detectados em cepas de UPEC isoladas no HRC

GENÓTIPOS	TOTAL	PS	INTER	PATOTIPO
<i>focA</i>	1	0	1	-
<i>chuA</i>	3	2	1	-
<i>chuA csgA pic</i>	1	0	1	-
<i>chuA pap csgA</i>	3	3	0	-
<i>csgA pCVD aggR</i>	1	0	1	EAEC
<i>fyuA chuA</i>	2	2	0	UPEC
<i>fyuA chuA csgA</i>	7	5	2	UPEC
<i>fyuA chuA focA pap csgA</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA chuA pap csgA</i>	4	4	0	UPEC
<i>fyuA chuA pap csgA pilS</i>	1	0	1	UPEC
<i>fyuA chuA pap cnf csgA</i>	2	2	0	UPEC
<i>fyuA chuA pap csgA ag43</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA chuA pap csgA ag43 pilS</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA chuA pap csgA pCVD aggR</i>	1	1	0	EAEC/UPEC
<i>fyuA chuA vat csgA</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA chuA vat pap csgA</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA chuA vat pap csgA ag43</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA csgA</i>	3	3	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA csgA pic</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA pap cnf csgA</i>	2	2	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA pap csgA</i>	4	2	2	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA pap csgA ag43 pilS</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA vat csgA</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA vat csgA pic</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA vat csgA pCVD aggR</i>	1	1	0	EAEC/UPEC
<i>fyuA yfcV chuA vat sfa cnf csgA</i>	2	1	1	UPEC/MNEC
<i>fyuA yfcV chuA vat sfa cnf csgA ag43</i>	1	0	1	UPEC/MNEC
<i>fyuA yfcV chuA vat sfa cnf csgA pic</i>	1	1	0	UPEC/MNEC
<i>fyuA yfcV chuA vat focA pap sfa cnf csgA</i>	2	1	1	UPEC/MNEC
<i>fyuA yfcV chuA vat focA pap sfa cnf csgA pic</i>	1	1	0	UPEC/MNEC
<i>fyuA yfcV chuA vat focA pap sfa cnf csgA ag43 pilS</i>	1	1	0	UPEC/MNEC
<i>fyuA yfcV chuA vat pap csgA</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA vat pap csgA pic</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA vat pap cnf csgA</i>	3	3	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA vat pap sfa cnf csgA</i>	3*	2	0	UPEC
<i>fyuA yfcV chuA vat pap cnf csgA ag43</i>	1	1	0	UPEC
<i>fyuA vat focA pap csgA ag43 pCVD aggR</i>	1	1	0	EAEC/UPEC
<i>vat focA csgA</i>	2	2	0	-
<i>yfcV chuA pap csgA</i>	1	1	0	-
Não Determinado	11	7	4	-
Total	78*	61	16	

* Para um dos pacientes não havia informação sobre clínica

Legendas: PS – Pronto-socorro; INTER – Internação

A adesão bacteriana a superfícies bióticas ou abióticas é passo indispensável para o processo de colonização. A adesão bacteriana é considerada um processo multifatorial no qual pode ocorrer a ação simultânea ou sequencial de vários fatores de adesão. No intuito de avaliar a influência dos fatores de virulência na adesão a superfície abiótica, foram conduzidos ensaios de formação de biofilme em amostras de urina com cepas de genótipos selecionados (Tabela 8). Dos 15 genótipos testados, 6 (40%) formaram biofilme em pelo menos metade das amostras de urina testadas. Dentre esses, um genótipo apresentava uma combinação de genes de EAEC (*pCVD⁺aggR⁺*) e UPEC. Os outros 5 genótipos formadores de biofilme apresentavam combinações genéticas típicas de cepas de UPEC. Dentre os genótipos de UPEC, o arranjo *fyuA chuA pap cnf csgA* foi caracterizado como a combinação mais eficiente na formação de biofilme, visto que apresentou formação de biofilme superior a média em 13 das 14 amostras de urina testadas (Tabela 8). Na sequência, os três genótipos que apresentaram melhor capacidade na formação de biofilme foram *fyuA chuA csgA* (formando biofilme em 12 das 14 amostras de urina testadas); *fyuA yFcv chuA vat focA pap sfa cnf csgA ag43 pilS* (com biofilme em 10 das 14 amostras testadas), e *fyuA yfcV chuA vat csgA pCVD aggR* (com biofilme em 9 das 14 amostras testadas). A combinação genética mínima e comum a estes genótipos foi *fyuA chuA csgA* detectada inclusive na cepa com genótipo EAEC/UPEC.

Os genes *fyuA* e *chuA* codificam receptores de superfície que interagem com sideróforos e, assim, compõem sistemas de aquisição de ferro. As concentrações de formas livres e solúveis de ferro na urina são extremamente baixas e são limitadoras da atividade bacteriana. Estudos sobre *fyuA* em cepas de UPEC têm demonstrado que a expressão deste gene é aumentada durante a formação de biofilme em ambientes privados do micronutriente ferro, como amostras de urina. Embora não apresente qualquer atividade adesiva, a expressão de *fyuA* tem sido demonstrada essencial para a formação de biofilme por cepas de UPEC e tem sido apontado como um fator de virulência devotado à formação de biofilme (HANCOCK; FERRIERES; KLEMM, 2008).

A expressão da fímbria curli (CsgA) revelou ser importante na formação de biofilmes sob diversas condições. A expressão diferencial de *csgA* por volta dos

30°C tem mostrado facilitar a colonização da região perianal aumentando os riscos de ITU em virtude da transposição das bactérias para sítios da região genito-urinária, como a uretra. Além disso, a expressão de *csgA* a 37°C tem sido relacionada à progressão por vias urinárias e a dispersão hematogênica por cepas de UPEC (HUNG *et al.*, 2014).

Tabela 8 – Formação de biofilme* por genótipos selecionados de cepas de UPEC em diferentes amostras de urina.

			AMOSTRAS DE URINA TESTADAS PARA A FORMAÇÃO DE BIOFILME (OD±DP)													
			1	2	3	7	9	10	12	16	17	20	22	23	24	25
Cepas Testadas - Genótipos (biofilme acima da média)																
UPEC PROTÓTIPO - FVL2	(3/14)	0,126± 0,022	0,132± 0,012	0,112± 0,015	0,093± 0,002	0,106± 0,006	0,123± 0,009	0,179± 0,046	0,133± 0,002	0,287± 0,021	0,170± 0,005	0,119± 0,006	0,152± 0,010	0,186± 0,027	0,102± 0,009	
chuA	(7/14)	0,137± 0,017	0,134± 0,006	0,128± 0,008	0,139± 0,006	0,190± 0,002	0,177± 0,023	0,108± 0,007	0,193± 0,033	0,193± 0,020	0,126± 0,018	0,162± 0,006	0,204± 0,004	0,217± 0,017	0,160± 0,030	
fyuA chuA	(1/14)	0,104± 0,017	0,107± 0,005	0,149± 0,011	0,110± 0,010	0,155± 0,018	0,153± 0,0127	0,108± 0,006	0,160± 0,007	0,160± 0,002	0,110± 0,009	0,118± 0,004	0,112± 0,011	0,149± 0,009	0,146± 0,015	
fyuA chuA csgA	(12/14)	0,160± 0,027	0,188± 0,031	0,180± 0,022	0,185± 0,008	0,194± 0,006	0,185± 0,004	0,120± 0,008	0,178± 0,016	0,242± 0,0193	0,131± 0,019	0,155± 0,016	0,192± 0,024	0,248± 0,031	0,398± 0,203	
fyuA chuA pap csgA	(3/14)	0,119± 0,008	0,138± 0,015	0,117± 0,003	0,140± 0,009	0,161± 0,022	0,177± 0,012	0,116± 0,001	0,153± 0,002	0,182± 0,001	0,149± 0,012	0,136± 0,009	0,170± 0,017	0,231± 0,006	0,138± 0,016	
fyuA chuA pap cnf csgA	(13/14)	0,135± 0,015	0,181± 0,032	0,146± 0,007	0,208± 0,009	0,193± 0,012	0,197± 0,014	0,201± 0,039	0,196± 0,007	0,274± 0,046	0,192± 0,043	0,163± 0,034	0,161± 0,008	0,175± 0,011	0,165± 0,013	
fyuA yFcv chuA csgA	(3/14)	0,124± 0,014	0,124± 0,005	0,110± 0,003	0,113± 0,009	0,172± 0,015	0,171± 0,002	0,099± 0,003	0,133± 0,002	0,130± 0,013	0,117± 0,002	0,143± 0,013	0,142± 0,001	0,155± 0,000	0,135± 0,027	
fyuA yFcv chuA pap csgA	(4/14)	0,117± 0,002	0,119± 0,002	0,119± 0,007	0,144± 0,007	0,169± 0,032	0,150± 0,004	0,123± 0,009	0,137± 0,008	0,180± 0,014	0,156± 0,002	0,137± 0,016	0,172± 0,027	0,235± 0,017	0,156± 0,001	
fyuA yFcv chuA vat pap cnf csgA	(7/14)	0,125± 0,031	0,117± 0,004	0,120± 0,013	0,109± 0,002	0,142± 0,016	0,139± 0,005	0,158± 0,038	0,150± 0,005	0,227± 0,038	0,180± 0,017	0,172± 0,031	0,212± 0,021	0,286± 0,023	0,171± 0,014	
fyuA yFcv chuA vat pap sfa cnf csgA	(5/14)	0,118± 0,007	0,120± 0,005	0,122± 0,017	0,121± 0,003	0,158± 0,005	0,152± 0,005	0,191± 0,049	0,143± 0,015	0,312± 0,056	0,136± 0,038	0,142± 0,006	0,196± 0,022	0,232± 0,002	0,228± 0,036	
fyuA yFcv chuA vat focA pap sfa cnf csgA	(4/14)	0,132± 0,021	0,134± 0,014	0,130± 0,021	0,114± 0,012	0,158± 0,031	0,166± 0,002	0,197± 0,088	0,155± 0,007	0,317± 0,021	0,166± 0,028	0,140± 0,007	0,139± 0,019	0,192± 0,003	0,147± 0,012	
fyuA yFcv chuA vat focA pap sfa cnf csgA ag43 pilS	(10/14)	0,120± 0,003	0,149± 0,004	0,153± 0,019	0,154± 0,010	0,180± 0,031	0,155± 0,020	0,210± 0,055	0,157± 0,006	0,302± 0,037	0,177± 0,023	0,150± 0,024	0,170± 0,018	0,270± 0,037	0,173± 0,015	
EAEC PROTÓTIPO - 042																
csGA pCVD aggR	(7/14)	0,162± 0,019	0,603± 0,001	0,218± 0,019	0,096± 0,005	0,170± 0,010	0,145± 0,002	0,139± 0,021	0,461± 0,051	0,162± 0,018	0,181± 0,013	0,120± 0,003	0,112± 0,015	0,502± 0,164	0,098± 0,004	
fyuA chuA pap csgA pCVD aggR	(0/14)	0,111± 0,004	0,103± 0,000	0,115± 0,005	0,109± 0,006	0,148± 0,002	0,139± 0,024	0,098± 0,002	0,128± 0,007	0,129± 0,010	0,113± 0,004	0,114± 0,015	0,133± 0,020	0,144± 0,025	0,128± 0,005	
fyuA yFcv chuA vat csgA pCVD aggR	(3/14)	0,136± 0,025	0,140± 0,004	0,142± 0,014	0,134± 0,014	0,174± 0,018	0,138± 0,005	0,133± 0,022	0,155± 0,010	0,174± 0,016	0,127± 0,005	0,123± 0,002	0,131± 0,023	0,169± 0,007	0,154± 0,008	
fyuA vat focA pap csgA ag43 pCVD aggR	(9/14)	0,172± 0,019	0,169± 0,015	0,198± 0,030	0,230± 0,057	0,226± 0,018	0,206± 0,010	0,114± 0,015	0,206± 0,024	0,186± 0,019	0,120± 0,005	0,163± 0,017	0,159± 0,011	0,181± 0,009	0,150± 0,014	
Biofilme Médio		0,132± 0,023	0,165±0,11 1	0,139± 0,033	0,135± 0,042	0,167± 0,031	0,161± 0,025	0,145± 0,047	0,176± 0,076	0,217± 0,065	0,149± 0,032	0,143± 0,029	0,159± 0,032	0,232± 0,091	0,163± 0,082	

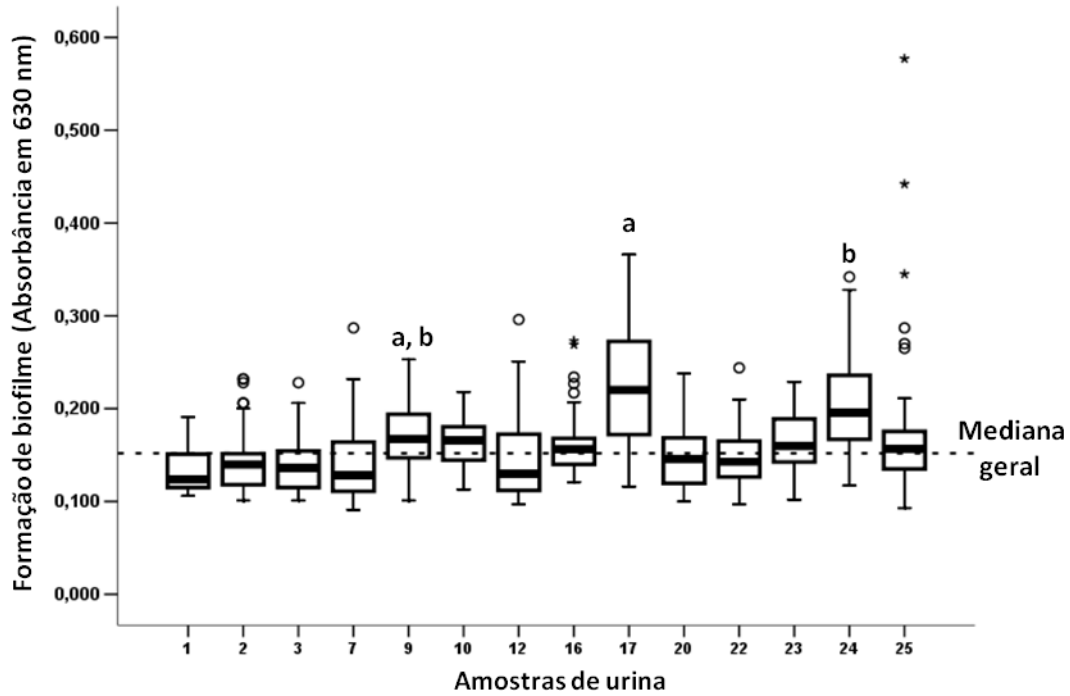
* As células com preenchimento indicam cepas com formação de biofilme em nível superior à média geral da população testada por amostra de urina.

Nos ensaios de formação de biofilme, ficou aparente que algumas amostras de urina frequentemente promoviam formação de biofilme em níveis superiores quando comparados aos dados de formação de biofilme das cepas testadas nas demais amostras de urina.

O gráfico 4 mostra que a mesma coleção de cepas resultou na formação de biofilme em intensidades diferentes (mediana), dependendo da amostra de urina testada. Assim, nota-se que as amostras de urina 17 e 24 promoveram aumento significativo na formação de biofilme ($p = 0,05$) quando comparadas às demais e à mediana geral. Por outro lado, foi notório que as amostras de urina 1, 2, 3 e 12 mostraram condições menos favoráveis à formação de biofilme, produzindo valores abaixo da mediana geral.

A urina humana é um fluido complexo formado durante o processo de ultrafiltração glomerular. Assim, a composição da urina reflete as variações sistêmicas de cada indivíduo sejam de ordem metabólica, hormonal ou de eletrólitos. É conhecido que a capacidade de adesão bacteriana, bem como a expressão de virulência em geral, é sensível a metabólitos, hormônios e eletrólitos (HANCOCK; FERRIERES; KLEMM, 2008; HANNAN; HOOTON; HULTGREN, 2013). O perfil da composição das amostras de urina está sendo realizado para uma futura análise em busca de possíveis associações que expliquem a capacidade diferenciada das amostras de urina para a formação de biofilme por cepas de UPEC.

Gráfico 4 – Amostras diferentes de urina promovem a formação de biofilme em intensidade variável quando testadas com uma mesma coleção de cepas de UPEC



a, b - $p < 0,05$ para a comparação entre dois grupos (teste de Mann-Whitney para amostras independentes)

6. CONCLUSÃO

- Os genes de virulência mais frequentemente detectados nas cepas de UPEC foram *chuA* (receptor de sideróforo), *csgA* (fímbria curli), *fyuA* (receptor de sideróforo) e *pap* (fímbria associado à piolonefrite).
- Cepas isoladas de crianças são potencialmente mais virulentas comparadas às cepas que causam ITU em adultos.
- A frequência de *chuA*, *csgA*, *fyuA* e *chuA* foi significativamente superior em cepas causando ITU em crianças.
- A carga de virulência (genes/cepa) em cepas isoladas de crianças foi significativamente superior a das cepas de adultos.
- Foram definidos 4 patotipos genéticos de *E. coli* associados a ITU, UPEC, UPEC/MNEC, UPEC/EAEC e EAEC. Além disso, 11 cepas apresentaram genótipo indeterminado, indicando que outras categorias patogênicas podem estar associadas.
- A caracterização genética mostrou a presença de 40 genótipos diferentes, o que demonstra a variabilidade dos genótipos capazes de causar ITU.
- Preditores genéticos de MNEC (*sfa* e *cnf*) foram detectados em 8 (10,2%) cepas compondo 6 genótipos diferentes, maior parte destes estavam associados a ITU em crianças.
- Mosaicismo genético de preditores de EAEC e UPEC foi detectado em 3 cepas consideradas então heteropatogênicas.
- As análises de formação de biofilme mostraram 6 genótipos com capacidade de formar biofilme superior à média da população.
- A combinação genética mínima e comum aos genótipos que melhor formaram biofilme foi *fyuA chuA csgA*.
- Para uma mesma coleção de cepas testadas, diferentes amostras de urina promovem formação de biofilme em intensidades diferentes, o que indica que a composição da urina pode interferir na capacidade de adesão das cepas de UPEC.

7. PERSPECTIVAS

- Ampliar a coleção de cepas de *E. coli* isoladas de infecções extra-intestinais atendidas no Hospital Regional de Ceilândia.
- Ampliar a caracterização genéticas das cepas contemplando marcadores genéticos de outros patótipos de *E. coli*.
- Avaliar a ocorrência de cepas de *E. coli* heteropatogênicas isoladas de bacteremia ou meningite.
- Realizar análise de clonalidade por meio de ensaio de *Multilocus Sequence Typing* (MLST).
- Determinar parâmetros bioquímicos em amostras de urina humana que influenciem a formação de biofilme por cepas de UPEC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, C. M. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunol.Med.Microbiol.** v. 52, no. 3, p. 397-406, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Trato Urinário: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde, 2009, 14p.

ANDERSON, G. G.; DODSON, K. W. ; HOOTON, T. M.; HULTGREN, S. J. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. **Trends Microbiol.** v. 12, n. 9, p. 424-430, 2004.

BADGER, J. L.; WASS, C. A.; WEISSMAN S. J.; KIM K. S. Application of signature-tagged mutagenesis for identification of *Escherichia coli* K1 genes that contribute to invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Infect. Immun.** v. 68, no. 9, p. 5056-5061, 2000.

BEKAL, S. R.; BROUSSEAU, L.; MASSON, G.; PREFONTAINE, J.; FAIRBROTHER, J.; HAREL. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n. 5, p. 2113-2125, 2003.

BHAT, R. G.; KATY, T. A.; PLACE, T. A. Pediatric urinary tract infections. **Emerg. Med. Clin. North Am.** v. 29, n. 3, p. 637-653, 2011.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. **EMBO Mol. Med.** v. 6, n. 3, p. 347-357, 2014.

BINGEN, E., PICARD, B.; BRAHIMI, N.; MATHY, S.; DESJARDINS, P.; ELION, J.; DENAMUR, E. 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, n. 3, p. 642-650, 1998.

BISHARA, J., LEIBOVICI, L.; HUMINER, L.; DRUCKER, M.; SAMRA, Z.; KONISBERGER, H.; PITLIK, S. Five-year prospective study of bacteraemic urinary

tract infection in a single institution. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 16, n. 8, p. 563-567, 1997

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS Suppl**, n. 136, p. 1-51. 2013

BJARNSHOLT, T.; ALHEDE, M.; ALHEDE, M.; EICKHARDT-SORENSEN, S. R.; MOSER, C.; M. KUHL, M.; JENSEN, P. O.; HOIBY, N. The *in vivo* biofilm. **Trends Microbiol.** v. 21, n. 9, p. 466-474, 2013.

BJARNSHOLT, T., CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HOIBY N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 12, n. 10, p. 791-808, 2013.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUNOA, F.; A. JUAREZ, A.; BLANCO J. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Res. Microbiol.** v. 148, n. 9, p. 745-755, 1997.

BLUM-OEHLER, G.; DOBRINDT, U.; JANKE, B.; NAGY, G.; PIECHACZEK, K.; HACKER, J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and evolution of virulence. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 485, p. 25-32, 2000.

BRZUSZKIEWICZ, E. *et al.* Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enterotoxigenic-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). **Arch. Microbiol.** v. 193, n. 12, p. 883-891, 2011.

CHATTAWAY, M. A. *et al.* Evidence of Evolving Extraintestinal Enterotoxigenic *Escherichia coli* ST38 Clone. **Emerg. Infect. Dis.** v. 20, n. 11, p. 1935-1937, 2014.

CLERMONT, O. *et al.* Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infect. Genet. Evol.** v. 11, n. 3, p. 654-662, 2011.

CORNISH, J.; VANDERWEE, M.; MILLER, T. Mucus stabilization in the urinary bladder. **Br. J. Exp. Pathol.** v. 68, no. 3, p. 369-375, 1987.

DHAKAL, B. K. & MULVEY, M. A. The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. **Cell Host.Microbe.** v. 11, n. 1, p. 58-69, 2012.

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; GHIGO, J. M.; LATOUR-LAMBERT, P. ; HORMAZABAL, J. C.; NATARO, J. P. 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, n. 4, p. 2102-2114, 2006.

EMODY, L.; KERENYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v. 22, n. 2, p. 29-33, 2003.

ENERBACK, S.; LARSSON, A. C. ; LEFFLER, H.; LUNDELL, A.M. P. DE; NILSSON B.; SVANBORG-EDEN. C. Binding to galactose alpha 1----4galactose beta-containing receptors as potential diagnostic tool in urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.** v. 25, n. 2, p. 407-411, 1987.

FOXMAN, B.; MANNING, S. D.; TALLMAN, P.; BAUER, R.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J. S.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J. D.; MARRS, C. F. Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E. coli* to be shared between heterosexual sex partners. **Am. J. Epidemiol.** v. 156, n. 12, p. 1133-1140, 2002.

GUAY, D. R. Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. **Drugs.** v. 68, n. 9, p. 1169-1205, 2008.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLDORFER, I.; TSCHAPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol. Microbiol.** v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HANCOCK, V.; FERRIERES, L.; KLEMM, P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. **Microbiology.** v. 154, n. 1, p. 167-175, 2008.

HANNAN, T. J.; HOOTON, T. M.; HULTGREN, S. J. Estrogen and recurrent UTI: what are the facts? **Sci. Transl. Med.** v. 5, n. 190, p. 190, 2013.

HOOTON, T. M. & STAMM, W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* v. 11, no. 3, p. 551-581, 1997.

HUNG, C.; MARSCHALL, J.; BURNHAM, C. A.; BYUN, A. S.; HENDERSON, J. P. The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. **PLoS One.** v. 9, n. 1, p. 860-869, 2014.

JERMY, A. Bacterial pathogenesis: UPEC helps host to exfoliate. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 10, n. 3, p. 159, 2012.

JIDO, T. A. Urinary tract infections in pregnancy: evaluation of diagnostic framework. **Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.** v. 25, n. 1, p. 85-90, 2014.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 4, n. 1, p. 80-128, 199.

JOHNSON, J. R. & RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.** v. 295, n. 6-7, p. 383-404, 2005.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KASS, E. H. Pyelonephritis and Bacteriuria - A Major Problem in Preventive Medicine. **Annals of Internal Medicine.** v. 56, n. 1, p. 46-54, 1962.

KASS, E. H. Bacteriuria and the Pathogenesis of Pyelonephritis. **Laboratory Investigation.** v. 9, n. 1, p. 110-116, 1960.

KIKUCHI, T.; MIZUNOE, Y. ; TAKADE, A.; NAITO, S.; YOSHIDA, S. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. **Microbiol. Immunol.** v. 49, no. 9, p. 875-884, 2005.

KOCH, V. H., & ZUCCOLOTTO, S. M. [Urinary tract infection: a search for evidence]. **J. Pediatr. (Rio J.).** v. 79, n. 1, p. 97-106, 2003.

KOREA, C. G.; BADOURALY, R.; PREVOST, M. C.; GHIGO, J. M.; BELOIN, C. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. **Environ. Microbiol.**, v. 12, n. 7, p. 1957-1977, 2010.

LASARO, M. A.; SALINGER, N.; ZHANG, J.; WANG, Y.; ZHONG, Z.; GOULIAN, M.; ZHU, J. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 75, n. 1, p. 246-251, 2009.

LUTHJE, P. & BRAUNER, A. Ag43 promotes persistence of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in the urinary tract. **J. Clin. Microbiol.** v. 48, n. 6, p. 2316-2317, 2010.

MALIK, R. D., COHN, J. A.; BALES, G. T. Urinary retention in elderly women: diagnosis & management. **Curr. Urol. Rep.** v. 15, n. 11, p. 454, 2014.

MANSAN-ALMEIDA, R.; PEREIRA, A. L.; GIUGLIANO, L. G. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. **BMC Microbiol.** v. 13, p. 22, 2013.

MARRE, R.; KREFT, B.; HACKER, J. Genetically engineered S and F1C fimbriae differ in their contribution to adherence of *Escherichia coli* to cultured renal tubular cells. **Infect. Immun.** v. 58, n. 10, p. 3434-3437, 1990.

MORENO, E.; ANDREU, A.; PIGRAU, C.; KUSKOWSKI, M. A.; JOHNSON, J. R.; PRATS, G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. **J. Clin. Microbiol.** v. 46, n. 8, p. 2529-2534, 2008.

MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; HULTGREN, S. J. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. **Infect. Immun.** v. 69, n. 7, p. 4572-4579, 2001.

NAGY, G.; DOBRINDT, U.; KUPFER, M.; EMODY, L.; KARCH, H.; HACKER, J. Expression of hemin receptor molecule *chuA* is influenced by RfaH in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **Infect. Immun.** v. 69, n. 3, p. 1924-1928, 2001.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NAVARRO-GARCIA, F.; GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; GARCIA-TOVAR, C.; CASTRO, L. A. ; SALAZAR-GONZALEZ, H.; CORDOVA, V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the *Enterobacteriaceae* family, is a potent mucus secretagogue. **Infect. Immun.** v. 78, n. 10, p. 4101-4109, 2010.

NAVARRO-GARCIA, F.; SEARS, C.; ESLAVA, C.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 67, no. 5, p. 2184-2192, 1999.

OLSEN, A., JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. **Nature.** v. 338, n. 6217, p. 652-655, 1989.

OTT, M.; HOSCHUTZKY, H.; JANN, K.; VAN, D.I.; HACKER, J. Gene clusters for S fimbrial adhesin (*sfa*) and F1C fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function. **J. Bacteriol.** v. 170, n. 9, p. 3983-3990, 1988.

PARKKINEN, J.; KORHONEN, T. K.; PERE, A.; HACKER J.; SOINILA, S. Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis. **J. Clin. Invest.** v. 81, n. 3, p. 860-865, 1988.

PARKKINEN, J.; ROGERS, G. N.; KORHONEN, T.; DAHR, W.; FINNE, J. Identification of the O-linked sialyloligosaccharides of glycophorin A as the erythrocyte receptors for S-fimbriated *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 54, n. 1, p. 37-42, 1986.

PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S.; GIUGLIANO, L. G. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **J. Infect. Dis.** v. 195, n. 3, p. 366-374, 2007.

QUEIROS, M. I.; CIPRIANO, M. A. B.; SANTOS, M. C. L.; CARDOSO, M. V. L. M. L. Urinary infections and use of indwelling bladder catheter in pediatric unit. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 12, n. 2, p. 295-301, 2011.

RONALD, A. R. & HARDING G. K. Complicated urinary tract infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.** v. 11, n. 3, p. 583-592, 1997.

SNYDER, J. A.; HAUGEN, B. J.; BUCKLES, E. L.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; DONNENBERG, M. S.; WELCH, R. A.; MOBLEY, H. L. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. **Infect. Immun.** v. 72, n. 11, p. 6373-6381, 2004.

SPURBECK, R. R.; DINH, P. C.; WALK, S. T. ; STAPLETON, A. E.; HOOTON, T. M.; NOLAN, L. K.; KIM, K. S.; JOHNSON, J. R.; MOBLEY, H. L. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. **Infect. Immun.** v. 80, no. 12, p. 4115-4122. 2012

STAMM, W. E. Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis, and prevention. **Am. J. Med.** v. 91, n. 3, p. 65S-71S, 1991.

STAPLETON, A. E. Urinary tract infection pathogenesis: host factors. **Infect. Dis. Clin. North Am.** v. 28, n. 1, p. 149-159, 2014.

SVENSON, S. B.; HULTBERG, H.; KALLENIOUS, G.; KORHONEN, T. K.; MOLLBY, R.; WINBERG, J. P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: identification and chemical characterization of receptors. **Infection.** v. 11, n. 1, p. 61-67, 1983.

TAKAHASHI, A.; KANAMARU, S.; KURAZONO, H.; KUNISHIMA, Y.; TSUKAMOTO, T.; OGAWA, O.; YAMAMOTO, S. *Escherichia coli* isolates associated with uncomplicated and complicated cystitis and asymptomatic bacteriuria possess similar phylogenies, virulence genes, and O-serogroup profiles. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, n. 12, p. 4589-4592, 2006.

TORRES, A. G.; REDFORD, P.; WELCH, R. A.; PAYNE S. M. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. **Infect. Immun.** v. 69, n. 10, p. 6179-6185, 2001.

TOVAL, F. *et al.* Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.** v. 52, n. 2, p. 407-418, 2014.

TUKEL, C.; WILSON, R. P.; NISHIMORI, J. H.; PEZESHKI, M.; CHROMY, B. A.; BAUMLER, A. J. Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. **Cell Host. Microbe.** v. 6, n. 1, p. 45-53, 2009.

TULLUS, K. Vesicoureteric reflux in children. **Lancet.** 2014.

VALIQUETTE, L. Urinary tract infections in women. **Can. J. Urol.** v. 8, n.1, p. 6-12, 2001.

WAITUMBI, J. N.; DONVITO, B.; KISSERLI, A.; COHEN, J. H.; STOUTE, J. A. Age-related changes in red blood cell complement regulatory proteins and susceptibility to severe malaria. **J. Infect. Dis.** v. 190, n. 6, p. 1183-1191, 2004.

WAKIMOTO, N. *et al.* Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 71, n. 5, p. 687-690, 2004.

WESTERLUND, B. & KORHONEN, T. K. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. **Mol. Microbiol.** v. 9, n. 4, p. 687-694, 1993.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp. Mol. Pathol.** v. 85, n. 1, p. 11-19, 2008.

ZHAO, L.; GAO, S.; HUAN, H.; XU, X.; ZHU, X.; YANG, W.; GAO, Q.; LIU, X. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology.** v. 155, n. 5, p. 1634-1644, 2009.