



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

LORENA CRISTINA FERNANDES MESSIAS DA SILVA

**Estudo de fatores de virulência de *Escherichia coli*
uropatogênica (UPEC) envolvidos na formação de
biofilmes**

BRASÍLIA, DF
2017

LORENA CRISTINA FERNANDES MESSIAS DA SILVA

**Estudo de fatores de virulência de *Escherichia coli*
uropatogênica (UPEC) envolvidos na formação de
biofilmes**

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

2017

LORENA CRISTINA FERNANDES MESSIAS DA SILVA

**Estudo de fatores de virulência de *Escherichia coli*
uropatogênica (UPEC) envolvidos na formação de
biofilmes**

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
2017

1

A minha amada mãe e amiga, Núbia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, o mentor de todas as coisas e meu maior ouvinte, quero agradecer por Seu amor sem limites e por segurar minha mão para que me mantivesse firme até aqui.

À minha mãe Núbia, agradeço por toda a dedicação e carinho que me ofereceu e que me ajudaram a ser uma mulher mais forte e decidida. Sem você e o seu amor incondicional eu não estaria realizando os meus sonhos. Obrigada por ser minha fortaleza, por acreditar em mim e me ensinar a ser humilde e paciente. E ainda agradeço por ser quem és e ser meu exemplo de persistência e sabedoria. Eu não seria nada sem você.

Agradeço a minha família, por entender minha ausência em muitos momentos e por ser suporte para todas as minhas decisões. Obrigada por me incentivarem e por se orgulharem tanto de cada conquista minha.

Aos meus avós, Walquíria e Valdecir, um agradecimento especial por estarem sempre presentes, por todo o amor e carinho que dedicaram a mim e por nunca me deixar esquecer os motivos pelos quais iniciei essa jornada. Todo amor do mundo eu dedico a vocês.

Ao meu namorado e companheiro de vida, agradeço pela compreensão e palavras de apoio e força que sempre me direcionou. Obrigada por me dar tanto suporte e por estar comigo em todos os momentos. Você tornou essa jornada mais leve.

Impossível não registrar meu agradecimento ao meu orientador, por confiar em mim e ter paciência para me ensinar tanto sobre a microbiologia. Obrigada por dedicar tantas horas para compartilhar seu conhecimento, por entender minhas dificuldades e por me guiar pelos melhores caminhos. Sou uma grande admiradora do seu trabalho e da sua pessoa.

À minha amiga Fabiana, eu agradeço por dividir as angústias e alegrias que levaram a elaboração desse trabalho. Essa conquista também é sua.

Por fim, quero agradecer a todos os meus amigos especialmente os que estiveram ao meu lado quando precisei de apoio, ouvidos, suporte e afago.

RESUMO

Infecções do trato urinário (ITUs) são as infecções mais comuns em ambiente hospitalar e o segundo tipo mais frequente observado na população humana. A *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) é o agente etiológico mais frequentemente isolado nesse tipo de infecção. Por enfrentar mecanismos de defesas variados, as cepas de UPEC evoluíram com a aquisição de fatores de virulência, que contribuem para sua adesão as células do trato urinário e formação de biofilme, podendo acarretar em infecções crônicas ou de repetição. O objetivo do presente estudo foi determinar a associação entre fatores de virulência e a formação de biofilme em DMEM e urina produzidos por cepas de *E. coli* uropatogênica (UPEC). Os resultados demonstraram que 7,7 % das cepas de UPEC formaram biofilme forte em DMEM, enquanto 49,3% das cepas formaram biofilme forte em urina, quando comparadas a cepa de EAEC. Baseado na associação genótipo e biofilme foi possível estabelecer que *sfa* e *cnf* são fatores que, por si só, tem influência na formação de biofilme em DMEM. O gene *focA* no genótipo *fyuA chuA focA* e associado aos fatores *cnf* e *sfa* demonstrou impacto na formação de biofilme em DMEM. Ao passo que *vat* no genótipo *fyuA chuA vat* aumentou biofilme em DMEM e quando isolado impactou no aumento de biofilme em DMEM e urina.

Palavras-chave: *Escherichia coli* uropatogênica, biofilme, fatores de virulência

ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) are the most common infections in the hospital setting and the second most frequent type observed in the human population. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the most frequently isolated etiological agent in this type of infection. Due to the presence of several defense mechanisms, UPEC strains evolved with the acquisition of virulence factors, which contribute to their adhesion to urinary tract cells and biofilm formation, that can lead to chronic or recurrent infections. The objective of the present study was to determine the association between virulence factors and biofilm formation in DMEM and urine produced by uropathogenic *E. coli* strains (UPEC). The results showed that 7.7% of the UPEC strains formed a strong DMEM biofilm, while 49.3% of the strains formed a urine biofilm when compared to the EAEC strain. Based on the genotype and biofilm association it was possible to establish that *sfa* and *cnf* are factors that influence the formation of biofilms in DMEM. The *focA* gene in the *fyuA* genotype *chuA focA* and associated with the factors *cnf* and *sfa* showed an impact on the formation of biofilm in DMEM. Whereas *vat* in the genotype *fyuA chuA vat* increased biofilm in DMEM and when isolated it impacted on the biofilm increase in DMEM and urine.

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli*, biofilm, virulence factors

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVO	19
3.1. OBJETIVO GERAL	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. METODOLOGIA	20
4.1. COLEÇÃO DE CEPAS DE UPEC	20
4.2. AMOSTRAS DE URINA	20
4.3. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES	20
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas da formação de biofilme

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição de frequência dos fatores de virulência em função da formação de biofilme ausente em DMEM e urina.

Tabela 2 – Genótipos e associação ao aumento na formação de biofilme em DMEM e urina.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

CV – Cristal Violeta

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EAS - Elementos Anormais do Sedimento urinário

ITU - Infecção do trato urinário

LB – Luria Broth

µL – microlitro

µm – nanometro

mL – mililitro

ST – Sequence type

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

1. INTRODUÇÃO

Infecções do trato urinário (ITUs) são as infecções mais comuns em ambiente hospitalar e o segundo tipo mais frequente observado na população humana (STAPLETON, 2014; GONZÁLEZ *et al* 2017). A prevalência das infecções do trato urinário varia de acordo com gênero e idade. Crianças, principalmente nos primeiros anos de vida, tem maior prevalência de ITU. Esse fato pode ser explicado por uma incidência de malformações congênitas, especialmente na válvula uretral posterior em meninos, e à facilidade de contaminação das vias urinárias por agentes da microbiota intestinal durante a higienização (BHAT; KATY; PLACE, 2011). No gênero feminino, a prevalência acentua-se na fase adulta, com aumento da incidência durante a fase de atividade sexual, gestação e menopausa. (HEILBERG *et al.* 2003). A maior susceptibilidade das mulheres as ITUs é atribuída ao fato de que a uretra feminina é mais curta e há proximidade maior do ânus com o vestíbulo vaginal e uretra. Em homens, a uretra com maior comprimento e o fator antibacteriano prostático conferem proteção a esse tipo de infecção (HORNER *et al.* 2006). A *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) é o agente etiológico mais frequente desse tipo de infecção. Cepas de UPEC são responsáveis por 75% a 95% das infecções urinárias em indivíduos saudáveis e 95% das ITUs acometem as vias urinárias inferiores (uretra e bexiga), sendo consideradas infecções não complicadas (CORDEIRO, 2016; SUBASHCHANDRABOSE, 2014).

A espécie *Escherichia coli* é habitante natural da microbiota intestinal dos seres humanos e coloniza o intestino humano poucas horas após o nascimento, sendo essencial durante a vida para auxiliar na fisiologia intraintestinais. (GERMANIER, 2012). De maneira geral, a *E. coli* permanece no lúmen intestinal, estabelecendo uma relação simbiótica com seu hospedeiro e raramente, quando se trata de espécies comensais, é capaz de causar infecção. Entretanto, quando se trata de um hospedeiro imunossuprimido ou caso a barreira gastrointestinal seja rompida até mesmo cepas consideradas não patogênicas podem causar infecção (NATARO & KAPER, 1998). Além da capacidade de migrar para outros sítios e causar infecção mesmo quando se trata de cepas comensais, linhagens de *Escherichia coli* podem evoluir com a aquisição de inúmeros genes de virulência. A espécie tem seu genótipo formado 2.000 genes em média, embora aproximadamente 10.000 genes, em grande parte genes de virulência, sejam conhecidos em *E. coli*. Isso ocorre devido a perdas e ganhos

constantes de genes, através da transferência horizontal, o que resulta em genótipos diversos e contribuem com a alta capacidade patogênica da espécie (CLERMONT *et al.*, 2011). Os patotipos dessa espécie são categorizados de acordo com o sítio de infecção abrangendo doenças entéricas e diarreicas, infecções do trato urinário, sepse e meningite. A detecção molecular de arranjos específicos de genes de virulência que estão associados à adesão bacteriana, tais como, fímbrias e adesinas patotipo-específicas, toxinas e hemolisinas, a sistemas de secreção, e a sistemas de aquisição de ferro (sideróforos) são os fatores que servem de embasamento para a classificação dos patotipos de *E. coli* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO & KAPER, 1998).

Por enfrentar mecanismos de defesas variados, tais como, o fluxo urinário, moléculas com atividade antibacteriana e atividade por parte de células do sistema imunológico, cepas de *E. coli* uropatogênica (UPEC) desenvolveram meios para aderir e invadir mucosas do trato urinário. Utilizando fatores de virulência, cepas de UPEC tornam-se tão eficientes em sua patogênese que há grande prevalência e recorrência de ITUs, o que a coloca como agente etiológico principal dessas infecções. Entre os fatores de virulência associados à UPEC, os fatores de adesão costumam ser determinantes para patogenicidade, pois é a partir da adesão de cepas UPEC as células do trato urinário que a eliminação das bactérias, provocada pelo fluxo de urina, é evitada. Outra maneira na qual os fatores de adesão podem também contribuir para a virulência é podendo proporcionar o aumento da adesão bacteriana e a invasão das células hospedeiras a partir da ativação de vias de sinalização das células do hospedeiro (GUAY, 2008).

Bactérias podem se alocar em comunidades sésseis aderidos às superfícies, ao invés de adotar um crescimento planctônico. Estas comunidades microbianas crescem envoltas por matrizes poliméricas extracelulares denominados biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1995; COSTERTON *et al.*, 1999). Infecções com formação de biofilme bacteriano são problemáticas, visto que bactérias organizadas nessas comunidades sésseis se tornam até 1000 vezes mais resistente à antimicrobianos e biocidas do que as células bacterianas planctônicas (COSTERTON *et al.*, 1995, 1999). Outro ponto importante é que infecções crônicas ou de repetição geralmente envolvem a formação de biofilmes e exigem um tratamento mais intenso, causando um maior impacto clínico (BJARNSHOLT, 2013). Os biofilmes podem se formar em

resposta a mudanças ambientais, o que pode alterar o metabolismo dessas bactérias e a expressão de alguns genes bacterianos inclusive genes de virulência (GONZÁLEZ *et al*,2017). Para aderir a superfícies e ser capaz de consolidar o biofilme, as bactérias utilizam fatores de virulência denominados adesinas, fimbriais e não-fimbriais, que são essenciais à patogenicidade bacteriana. Dentre esses benefícios de possuir esses fatores de virulência, pode se destacar o aumento da eficiência na adesão bacteriana as células do trato genito-urinário, tornando possível a colonização da bexiga urinária e prevenindo a remoção das células bacterianas durante a micção (SINGH, 2016). Dentre os principais fatores para o estabelecimento da infecção no trato urinário, estão as adesinas (fímbria do tipo 1, fímbria P, fímbria S, adesinas Afa/Dr, proteínas autotransportadoras), que promovem a colonização e formação de biofilme (TIBA *et al*, 2009).

Dentre os fatores de virulência comumente encontrados em *E. coli*, os genes *fyuA* (codificador de receptor de sideróforo), *chuA* (codificador de proteína ligadora do grupo heme) e *vat* (toxina vacuolizante) são tidos preditores estatístico de UPEC, com evidências de que facilitam a colonização da bexiga e são expressos no crescimento em urina humana. (KOREA *et al.*, 2010; SPURBECK *et al.*, 2012). O gene *focA* (codificador de fímbria F1C) é importante para adesão bacteriana a células da bexiga e as células dos túbulos renais, enquanto *pap* é codificador de fímbria P e há evidências de que está associado a quadros de pielonefrite (JOHNSON, 1991; LASARO *et al.*, 2009; JOHNSON, 1991 MARRE; KREFT; HACKER, 1990). Quanto a *csgA*, trata-se de um gene que codifica fímbrias *curli* e está amplamente envolvido com adesão a celular, colonização da região perineal e formação de biofilme (EMODY; KERENYI; NAGY, 2003; WESTERLUND; KORHONEN, 1993). O gene *sfa* é responsável por codificar fímbria S e as evidências demonstram que contribui para adesão ao endotélio vascular e células epiteliais (PARKKINEN *et al.*, 1988). O gene *cnf* é um fator necrosante citotóxico que demonstrou estar associados a alguns quadros meningites causadas por *E. coli* (BADGER *et al.*, 2000).

Múltiplos fatores contribuem para o desenvolvimento e manutenção dos biofilmes bacterianos. Os requisitos que corroboram para formação de biofilmes podem variar de acordo com as condições ambientais, interação patógeno-hospedeiro, capacidade de adaptação da espécie, pela expressão concomitante de fatores de adesão (CEGELSKI,2009; MAY, 2011; TIBA,2009). Fatores bacterianos

não associados a adesão, como por exemplo sideróforos, mostraram-se importantes para a formação de biofilme em *E. coli*, demonstrando a natureza multifatorial desse processo (MAGISTRO, 2015). Para que haja formação de biofilme, são descritas cinco etapas básicas (Figura 1), embora possa haver algumas variações entre certas espécies bacterianas. A primeira etapa compreende na ligação reversível das bactérias de vida planctônicas á superfícies e/ou células. Nesse momento, o flagelo bacteriano é uma importante estrutura para auxiliar nessa ligação. A segunda etapa compreende na mudança de expressão de genes, que pode levar a produção de adesinas como fímbria tipo 1, fímbria *curli* e antígeno 43 que auxiliam na ligação irreversível com as superfícies. A terceira etapa consiste na produção e formação da matriz extracelular de polissacarídeos. No caso da espécie *Escherichia coli*, essa matriz é composta por substâncias tais como: celulose, poliglucosamina e ácido colônico. A etapa quatro é atribuída ao crescimento do biofilme, onde o mesmo torna-se uma estrutura tridimensional, denominada de macro colônia. Por fim, a quinta etapa acontece quando as bactérias voltam ao estado planctônico desprende-se do biofilme, podendo levar formação de um novo biofilme em outra superfície. (SOTO, 2014; GONZÁLEZ *et al*,2017)

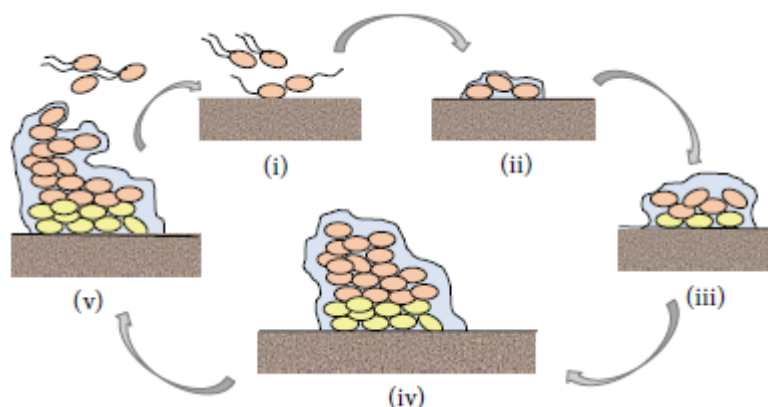


Figura 1: Etapas da formação de biofilme (i) ligação reversível de bactérias planctônicas com a superfícies (ii) ligação irreversível (iii) formação da matriz extracelular (iv) crescimento do biofilme em forma tridimensional (v) desprendimento do biofilme (Fonte: SOTO, 2014).

Existem diversas técnicas para a analisar a formação de biofilme *in vitro*. A exemplo disso, os ensaios de biomassa são bastante utilizados observar o desenvolvimento e formação de biofilme que tem por característica quantificar a matriz extracelular e seus componentes e as células (vivas e mortas). Há também os ensaios que avaliam apenas condições específicas do biofilme como o ensaio de viabilidade,

onde é quantificado apenas as células viáveis e o ensaio de quantificação de matriz, onde é utilizado um corante específico para a matriz extracelular. Em geral, a técnica mais comum para quantificar biofilme em *E. coli* é determinação da densidade óptica produzida por corantes adsorvidos a matriz do biofilme formado (CULLER, 2010).

O estudo a seguir é de caráter epidemiológico, direcionado a avaliar a associação de fatores moleculares (genótipo) com a formação de biofilme de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC). A caracterização de cepas de *E. coli* através do perfil genético e a formação de biofilme é uma importante ferramenta para compreender os mecanismos de patogênese de bactérias causadoras de infecções do trato urinário.

2. JUSTIFICATIVA

A *E. coli* é o agente infeccioso mais frequentemente isolado em laboratórios clínicos e é apontada como principal microrganismo causador de infecções do trato urinário (ITUs), sendo também responsável por ser uma das fontes mais comuns de bacteremia em indivíduos hospitalizados. Essa ampla infectividade deve-se a facilidade com que essa enterobactéria explora os diversos mecanismos de virulência com objetivo de estabelecer colonização de sítios específicos nos seres humanos.

Há diversas cepas *E. coli* uropatogênicas que têm como característica formação de biofilme bacteriano, propriedade que confere importantes vantagens a esses microrganismos tais como: resistência à desidratação e oxidação e maior tolerância a detergentes e antimicrobianos. Diversas linhagens de *E. coli* patogênicas ou comensais são capazes de colonizar superfícies pela expressão de estruturas de adesão e alguns fatores de virulência podem estar associados a esse processo, contribuindo para a formação de biofilme.

A formação de biofilme nas ITUs tem forte impacto clínico, visto que expõe o paciente a ITUs de repetição. Por isso, compreender os mecanismos que viabilizam as infecções do trato urinário e seus fatores de virulência são importantes ferramentas para desenvolver estratégias para prevenir e tratar as ITUs.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre genes de virulência e a formação de biofilmes em urina e DMEM produzida por cepas de *E. coli* uropatogênica (UPEC) isoladas de infecções do trato urinário em pacientes atendidos Hospital Regional de Ceilândia.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a intensidade de formação de biofilme em uma coleção de cepas previamente genotipadas.
- Analisar a distribuição de frequência de genes de virulência em função da intensidade do biofilme formado.
- Identificar genes ou genótipos associados ao aumento da formação de biofilme.

4. METODOLOGIA

4.1. COLEÇÃO DE CEPAS DE UPEC

O trabalho utilizou a coleção de cepas de UPEC isoladas de ITUs atendidas no Hospital Regional de Ceilândia (HRC) no Distrito Federal. As cepas estão preservadas em meio LB (Luria Broth) semissólido e armazenadas no laboratório da Faculdade de Ceilândia (FCE/UnB). Um subgrupo de 77 cepas desta coleção foi selecionado utilizando como critério de inclusão cepas com o maior número de informações acerca de sua caracterização genética, tais como ST, filogrupo, genótipo testado para pelo menos 10 genes (Lara,2017).

4.2. AMOSTRAS DE URINA

As amostras de urinas foram coletadas de estudantes mulheres da UnB *Campus* Ceilândia por micção espontânea matutina, recuperando o jato médio (50 mL). Mediante a um questionário, afirmaram não fazer uso de anticoncepcional, antibióticos e anti-inflamatórios por um período menor que 20 dias da data da coleta.

As amostras de urina foram centrifugadas à 3000 g e filtradas em membrana com porosidade de 0,22 µm. Foram conservadas sob refrigeração até o momento do uso. Um *pool* com 3 amostras de urina suplementado com casoaminoácido à 0,5% foi utilizado como meio de cultura nos ensaios de formação de biofilme.

4.3. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os ensaios de biofilme foram realizados baseados no método descrito por Wakimoto *et al.* (2004) com modificações, utilizando placas de poliestireno com 96 poços (WAKIMOTO *et al.*, 2004). As 77 cepas de UPEC foram recuperadas do LB semissólido para tubos com LB caldo. Os tubos foram incubados sob agitação à 37 °C por um período de 18 horas. Os ensaios de biofilme foram realizados em urina e em meio DMEM suplementado com 0,5% de casoaminoácido. Os poços foram preenchidos com 200 µL de DMEM/urina e inoculados com 5 µL de cultura em caldo LB. O ensaio foi incubado por 18 horas em estufa à 37 °C. Após esse período, o meio foi descartado, os poços foram lavados com água destilada e a placa levada a estufa para secar.

Para corar o biofilme, 100 µL de solução aquosa de cristal violeta (CV) à 0,1% foram

adicionados a cada poço e deixados por 15 minutos. A escolha do CV como corante para biofilme foi devido a afinidade do corante com moléculas carregadas negativamente, células e policassarídeos que compõem a matriz extracelular do biofilme. Logo após, a solução foi descartada e os poços lavados novamente com água destilada e a placa levada a estufa para secar.

Posterior a esse processo, foi realizado, em espectrofotômetro de microplaca, a leitura da absorvância ($\lambda = 630 \text{ nm}$) do CV adsorvido ao biofilme. Então, 100 μL de etanol foram adicionados a cada poço e a determinou-se a leitura da absorvância ($\lambda = 630 \text{ nm}$) do CV solubilizado. Os biofilmes foram quantificados utilizando a média do cristal violeta adsorvido ao poço somado ao cristal violeta solubilizado por etanol. Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes, utilizando como controles positivos a cepas 17.2 (diarreiogênica) e FVL2 (uropatogênica) e como controles negativos a cepa C600 (comensal) e J53 (comensal). Foram consideradas como formadoras de biofilme, as cepas de UPEC que formaram biofilme em níveis superiores à média da população geral testada; e como exímios formadores de biofilme (biofilme forte) cepas que formaram biofilme em níveis superiores ao protótipo de EAEC 17.2.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes a frequência dos genes de virulência nas cepas testadas para biofilme foram analisados por meio do teste exato de Fisher. As comparações envolvendo média foram analisadas com o teste T de Student, considerando a análise de variância (teste Levene). Resultados com valor de significância (p) menor ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

Setenta e sete cepas de UPEC foram testadas para a formação de biofilme. Quando testadas em DMEM, a média obtida foi de 0,626 e em urina média foi de 0,436. Em DMEM, 32 amostras (41,5%) foram consideradas formadoras de biofilme, pois produziram biofilme em níveis iguais ou superiores à média da população testada. Em urina, 38 amostras (49,3%) foram classificadas como formadoras de biofilme utilizando o mesmo critério. Quando comparadas a cepa protótipo de EAEC 17.2 (prolífica formadora de biofilme), 6 cepas (7,7%) de UPEC formaram biofilme forte em DMEM, pois obtiveram média de formação de biofilme superior a EAEC 17.2, enquanto em urina 38 cepas (49,3%) formaram biofilme superior a cepa protótipo ($p = 0001$).

A distribuição de frequência dos fatores de virulência foi adotada para analisar a porcentagem de cada gene de virulência nos grupos formadoras e não formadoras de biofilme (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição de frequência dos fatores de virulência em função da formação de biofilme em DMEM e urina.

GENE	BIOFILME EM DMEM			BIOFILME EM URINA		
	Forma biofilme n= 32 (%)	Não forma biofilme n= 45 (%)	<i>p</i>	Forma biofilme n= 38 (%)	Não forma biofilme n= 39 (%)	<i>p</i>
<i>fyuA</i>	21 (65,6%)	40 (88,8%)	0,021	28 (73,6%)	33 (84,6%)	0,272
<i>yfcV</i>	12 (37,5%)	21 (46,6%)	0,487	0 (%)	33 (84,6%)	0,000
<i>chuA</i>	21 (65,6%)	39 (86,6%)	0,049	30 (78,9%)	30 (76,9%)	1,000
<i>vat</i>	15 (46,8%)	12 (26,6%)	0,090	4 (10,5%)	23 (58,9%)	0,000
<i>focA</i>	6 (18,7%)	6 (13,3%)	0,540	3 (7,8%)	9 (23,0%)	0,114
<i>pap</i>	15 (46,8%)	28 (62,2)	0,245	15 (39,4%)	28 (71,7%)	0,005
<i>sfa</i>	6 (18,7%)	3 (6,6%)	0,151	1 (2,6%)	8 (20,5%)	0,028
<i>cnf</i>	8 (25%)	3 (6,6%)	0,043	1 (2,6%)	10 (25,6%)	0,006
<i>csgA</i>	31 (96,8%)	43 (95,5%)	1,000	36 (94,7%)	38 (97,4%)	0,615
<i>ag43</i>	4 (12,5%)	6 (13,3%)	1,000	5 (13,1%)	5 (12,8%)	1,000

A tabela demonstrou que em DMEM, o gene *fyuA* aparece em maior frequência (88,8%) na população que não formadora de biofilme, enquanto *cnf* aparece mais frequentemente na população formadora de biofilme (25%). Em urina, *yfcV* (84,6%), *vat* (58,9%), *pap* (71,7%), *sfa* (20,5%) e *cnf* (25,6%) foram os fatores mais presentes no grupo de cepas não formadoras de biofilme.

A fim de analisar a influência dos fatores de virulência no aumento da média geral de biofilme em DMEM e urina, foi realizada uma análise e construída uma tabela (Tabela 2) mostrando 46 genes e genótipos a formação de biofilme.

Tabela 2 – Gene e genótipos associados a formação de biofilme em DMEM e urina.

GENÓTIPO	BIOFILME EM DMEM			BIOFILME EM URINA			
		Média	SE	P	Média	SE	P
<i>fyuA chuA yfcV vat focA^a</i>	+	1,081	0,217	0,002	0,560	0,098	0,102
	-	0,587	0,042		0,425	0,022	
<i>fyuA chuA yfcV vat sfa^a</i>	+	1,025	0,168	0,002	0,512	0,079	0,233
	-	0,579	0,042		0,427	0,022	
<i>fyuA chuA yfcV vat cnf^a</i>	+	0,954	0,146	0,004	0,473	0,067	0,517
	-	0,576	0,043		0,430	0,023	
<i>fyuA chuA yfcV vat pap</i>	+	0,790	0,127	0,147	0,490	0,061	0,225
	-	0,585	0,045		0,422	0,023	
<i>fyuA chuA yfcV vat csgA</i>	+	0,727	0,111	0,243	0,486	0,057	0,245
	-	0,598	0,047		0,422	0,023	
<i>fyuA chuA yfcV vat ag43</i>	+	0,847	0,304	0,320	0,413	0,032	0,836
	-	0,616	0,044		0,436	0,023	
<i>fyuA chuA yfcV pap ag43</i>	+	0,847	0,304	0,320	0,413	0,032	0,836
	-	0,616	0,044		0,436	0,023	
<i>fyuA chuA yfcV vat</i>	+	0,584	0,046	0,083	0,421	0,023	0,224
	-	0,770	0,113		0,486	0,053	
<i>fyuA chuA yfcV focA^a</i>	+	1,081	0,217	0,002	0,560	0,098	0,102
	-	0,587	0,042		0,425	0,022	
<i>fyuA chuA yfcV sfa^a</i>	+	1,025	0,168	0,002	0,512	0,079	0,243
	-	0,579	0,042		0,427	0,022	
<i>fyuA chuA yfcV cnf^a</i>	+	0,954	0,146	0,004	0,473	0,067	0,517
	-	0,576	0,043		0,430	0,023	
<i>fyuA chuA yfcV</i>	+	0,605	0,081	0,739	0,419	0,037	0,565
	-	0,636	0,052		0,445	0,027	
<i>fyuA chuA pap</i>	+	0,584	0,064	0,374	0,427	0,035	0,716
	-	0,663	0,061		0,443	0,028	
<i>fyuA chuA ag43</i>	+	0,625	0,154	0,997	0,433	0,088	0,971
	-	0,625	0,046		0,436	0,022	
<i>fyuA chuA cnf^a</i>	+	0,917	0,138	0,007	0,462	0,062	0,632
	-	0,576	0,044		0,431	0,023	
<i>fyuA chuA vat^a</i>	+	0,734	0,098	0,014	0,465	0,046	0,436
	-	0,587	0,098		0,425	0,025	
<i>fyuA chuA sfa^a</i>	+	0,971	0,157	0,004	0,494	0,072	0,342
	-	0,579	0,043		0,428	0,023	
<i>fyuA chuA focA</i>	+	0,903	0,199	0,169	0,494	0,084	0,374
	-	0,593	0,043		0,429	0,022	
<i>fyuA chuA csgA^a</i>	+	0,782	0,084	0,013	0,475	0,036	0,224
	-	0,550	0,049		0,417	0,027	

<i>chuA yfcV vat</i>	+	0,767	0,103	0,671	0,519	0,062	0,108
	-	0,578	0,047		0,408	0,020	
<i>chuA yfcV pap</i>	+	0,655	0,093	0,659	0,446	0,041	0,759
	-	0,612	0,049		0,431	0,026	
<i>chuA yfcV sfa^a</i>	+	1,025	0,168	0,002	0,512	0,079	0,243
	-	0,579	0,042		0,427	0,022	
<i>chuA yfcV focA^a</i>	+	1,081	0,217	0,002	0,560	0,098	0,102
	-	0,587	0,042		0,425	0,022	
<i>chuA yfcV cnf^a</i>	+	0,954	0,146	0,004	0,473	0,067	0,517
	-	0,576	0,043		0,430	0,023	
<i>fyuA ag43</i>	+	0,601	0,107	0,834	0,438	0,061	0,972
	-	0,629	0,048		0,435	0,023	
<i>fyuA csgA^a</i>	+	0,567	0,046	0,018	0,420	0,024	0,197
	-	0,814	0,105		0,487	0,047	
<i>fyuA cnf^a</i>	+	0,917	0,138	0,007	0,462	0,062	0,632
	-	0,576	0,044		0,431	0,023	
<i>fyuA sfa^a</i>	+	0,971	0,157	0,004	0,494	0,072	0,342
	-	0,579	0,043		0,428	0,023	
<i>fyuA pap</i>	+	0,583	0,060	0,335	0,431	0,032	0,836
	-	0,583	0,065		0,440	0,030	
<i>fyuA focA</i>	+	0,844	0,162	0,057	0,485	0,068	0,390
	-	0,592	0,044		0,428	0,023	
<i>fyuA vat</i>	+	0,754	0,091	0,058	0,471	0,041	0,304
	-	0,570	0,0488		0,421	0,026	
<i>fyuA chuA</i>	+	0,564	0,050	0,035	0,419	0,026	0,253
	-	0,769	0,085		0,475	0,039	
<i>fyuA yfcV</i>	+	0,597	0,074	0,604	0,415	0,034	0,443
	-	0,644	0,055		0,450	0,029	
<i>cnf focA^{a,b}</i>	+	1,391	0,144	0,000	0,633	0,135	0,036
	-	0,583	0,041		0,425	0,021	
<i>sfa focA^a</i>	+	1,220	0,204	0,000	0,601	0,109	0,216
	-	0,584	0,041		0,424	0,022	
<i>yfcV pap</i>	+	0,651	0,086	0,684	0,446	0,038	0,748
	-	0,612	0,051		0,431	0,027	
<i>chuA yfcV</i>	+	0,615	0,077	0,852	0,443	0,044	0,776
	-	0,632	0,054		0,430	0,023	
<i>csgA ag43</i>	+	0,601	0,107	0,834	0,438	0,061	0,972
	-	0,629	0,048		0,435	0,023	
<i>cnf csgA^a</i>	+	0,863	0,140	0,038	0,459	0,068	0,688
	-	0,590	0,045		0,432	0,023	
<i>focA</i>	+	0,845	0,152	0,125	0,481	0,052	0,382
	-	0,584	0,043		0,427	0,024	
<i>cnf^a</i>	+	0,917	0,138	0,007	0,472	0,062	0,632
	-	0,576	0,044		0,431	0,023	
<i>sfa^a</i>	+	0,971	0,157	0,004	0,494	0,072	0,342
	-	0,579	0,043		0,428	0,023	
<i>vat^{a,b}</i>	+	0,776	0,083	0,012	0,497	0,045	0,041
	-	0,544	0,048		0,402	0,022	
<i>pap</i>	+	0,591	0,057	0,399	0,429	0,030	0,748
	-	0,668	0,070		0,444	0,032	
<i>csgA</i>	+	0,622	0,044	0,699	0,435	0,023	0,919
	-	0,712	0,375		0,447	0,029	

^a indica genes ou genótipos associados ao aumento estatisticamente significativo de biofilme em DMEM e ^b em urina.

A análise de genótipos associada a biofilme mostrou que alguns genes influenciam a formação de biofilme quando analisados individualmente, enquanto que outros mostram influência quando formando genótipos específicos. Os genes *cnf*, *sfa* e *vat* quando selecionados individualmente foram associados ao aumento da formação de biofilme em DMEM. O fator de virulência *vat* mostrou-se o mais versátil na formação de biofilme, pois quando analisado isoladamente tem impacto na formação de biofilme tanto em urina quanto em DMEM.

Em contrapartida, outros genes mostraram influenciar o aumento da formação do biofilme apenas quando combinados em genótipos específicos. O gene *csgA* mostrou estar associado ao aumento da formação de biofilme apenas quando combinados aos genes *fyuA* e *chuA*, formando o genótipo *fyuA chuA csgA*. Enquanto em outras combinações, como *fyuA chuA yfcV vat csgA*, por exemplo, não apresentam significância quanto a formação de biofilme em DMEM e urina. De forma semelhante, o gene *focA* mostrou influenciar o aumento na formação de biofilme apenas quando combinado a genótipos formados por *chuA* e *yfcV*, como nos exemplos *fyuA chuA yfcV vat focA*, *fyuA chuA yfcV focA*, *chuA yfcV focA*. De forma interessante, o genótipo que melhor influenciou a formação de biofilme em DMEM e em urina foi *cnf focA*.

5.2 Discussão

O biofilme é um importante processo desenvolvido por cepas de UPEC a fim de colonizar de forma mais eficiente o trato urinário e promover infecções; além de conferir a esses microrganismos maior resistência a oxidação, desidratação e maior tolerância aos antimicrobianos. No experimento, as cepas de UPEC foram analisadas quanto a capacidade de formar biofilme em comparação a cepa protótipo de EAEC 17.2. O resultado observado foi que um grande número de cepas de UPEC não são exímias formadoras de biofilme em meio DMEM. Em contrapartida, grande parcela das cepas foram capazes de formar biofilme superior a cepa EAEC em urina. Outro fato demonstrado no experimento foi que alguns fatores de virulência testados, isolados ou em genótipos específicos, obtiveram resultados positivos quanto ao aumento na formação de biofilme em meio DMEM, em relação à média geral da população. Entretanto, não foi possível estabelecer essa associação quanto ao ensaio realizado em urina. Alguns fatores de virulência são relatados como preditores de

UPEC, a exemplo dos genes *fyuA*, *yfcV* e *chuA* (SPURBECK *et al.*, 2012). Porém, fatores de virulência são elementos genéticos móveis que podem ser transferidos para linhagens específicas. Eles podem ser codificados em regiões instáveis, como as ilhas de patogenicidade, ou estão localizados em plasmídeos e transposons (BEKAL *et al.*, 2003; BLUM-OEHLER *et al.*, 2000; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Isso significa que, não definem características que são intrínsecas a linhagem genética. As cepas de UPEC, no experimento, demonstraram maior inclinação a formar biofilme em urina. A partir disso, infere-se que a capacidade formar biofilme em urina pode ser um fator inerente as linhagens de UPEC e que a não há relação com a presença dos fatores de virulência testados. Nem mesmo o acúmulo de genes de virulência foi determinante para o aumento de biofilme em urina. Pois a combinação genética de maior impacto foi *cnf focA*, contendo apenas dois genes e *vat*, isolado, que também demonstrou importância na formação de biofilme em urina. Porém, a não associação dos fatores de virulência a formação de biofilme em urina, não exclui o fato de que genes de virulência interferem na formação de biofilme de maneira geral. Estudos relatam que genes envolvidos na síntese de sideróforos regulam positivamente a formação de biofilme por cepas de UPEC e que *focA* é um fator importante para que haja adesão de cepas de *E. coli* a superfícies abióticas e bióticas. (LASARO *et al.*, 2009; MANN, 2017). O experimento em questão, demonstrou esse fato através do ensaio de biofilme realizado em DMEM, onde cepas de UPEC que possuem determinados fatores de virulência estão habilitadas a formar biofilme acima da média da população geral.

Os fatores *sfa* e *cnf* demonstraram estar associados a formação de biofilme em DMEM, pois mesmo quando analisados de forma isolada foram estatisticamente significativos na formação de biofilme. Estudos mostram que o gene *sfa* está associado a infecções extraintestinais e *cnf* combinado a outros fatores de virulência é necessário para o desenvolvimento da cistite, em outros modelos animais (MEHDIPOUR, 2012; KNÖBL *et al.*, 2004; SALVARANI *et al.*, 2012;). Os fatores que foram impactantes para a formação de biofilme em DMEM não são adesinas ou fatores de adesão. Entretanto, a formação de biofilme é um evento complexo e pode envolver também fatores que não estão diretamente ligados a adesão (Pereira *et al.*, 2010). Fatores como como toxinas, mesmo que não estejam diretamente associados a formação de biofilme, tem impacto no hospedeiro e contribuem para promover a

infecção (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Outro ponto a ser enfatizado é que o meio DMEM mimetiza outros cenários (região perineal e cateteres urinários, por exemplo) onde as cepas de UPEC são capazes de colonizar e formar biofilme. Essa é uma importante estratégia bacteriana, visto que a colonização e adesão a região perineal, por exemplo, formam um reservatório bacteriano, permitindo que as bactérias ascendam para uretra e alcancem a bexiga causando ITU (SUBASHCHANDRABOSE, 2015).

A composição dos genótipos também mostrou ser importante no aumento da formação de biofilme. O gene *focA* mostrou relevância apenas quando associados a *chuA yfcv* e quando associado a *cnf* e *sfa*. Em análise isolada, não apresentou alterações positivas quanto a formação de biofilme. O fator *csgA* também demonstrou que associação com outros fatores de virulência reflete na sua capacidade de formar biofilme em DMEM. O acúmulo de fatores de virulência não foi relevante para que esse aumento de biofilme ocorresse. Contudo, genótipos específicos mostraram ser mais capazes de formar de biofilme em DMEM. O genótipo que melhor formou biofilme me meio DMEM e urina foi *cnf focA*, apesar de que dentre as combinações testadas genótipos de até 5 genes estavam inclusos, o genótipo contendo apenas dois genes foi o mais versátil e eficiente na formação de biofilme em ambos os meios, confirmando o fato de que a composição do genótipo sobrepõe o número de genes de virulência no aumento da formação de biofilme em DMEM.

6. CONCLUSÃO

- A capacidade de formação de biofilme em urina, por parte das cepas de UPEC, demonstrou ser uma característica das linhagens e que não sofre influência direta de estruturas moleculares móveis, como os fatores de virulência.
- Em DMEM, os fatores de virulência *vat*, *sfa* e *cnf* foram impactantes na formação de biofilme, quando analisado de forma isolada.
- O genótipo composto por *cnf focA* foi o mais versátil na formação de biofilme, visto que teve a maior adesão em relação a população geral em DMEM e urina. Esse fato demonstrou que o acúmulo de genes de virulência não está diretamente associado ao aumento da formação de biofilme em DMEM e urina.
- A composição dos genótipos é fator determinante para o aumento de biofilme em DMEM. O gene *foca* mostrou significância apenas quando associado ao genótipo *chuA yfcV*, e aos genes *cnf* e *sfa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAT, Rahul G.; KATY, Tamara A.; PLACE, Frederick C. Pediatric urinary tract infections. **Emergency medicine clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 637-653, 2011.

BADGER, J. L.; WASS, C. A.; WEISSMAN S. J.; KIM K. S. Application of signaturetagged 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, Sadjia *et al.* Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2113-2125, 2003.

CARLSSON, S. *et al.* In vitro evaluation of a new treatment for urinary tract infections caused by nitrate-reducing bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3713-3718, 2003.

CEGELSKI, Lynette *et al.* Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 12, p. 913-919, 2009.

CLERMONT, Olivier *et al.* Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, genetics and evolution**, v. 11, n. 3, p. 654-662, 2011.

CORDEIRO, Melina Aparecida *et al.* *Curli* fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Brazilian journal of microbiology*, v. 47, n. 2, p. 414-416, 2016.

COSTERTON JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711–745.

COSTERTON JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.

CULLER, Hebert Fabricio. **Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DARBANDI, Atieh *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes frequency in Khuzestan province of Iran. **Iranian journal of microbiology**, v. 8, n. 6, p. 352, 2016.

GERMANIER, René (Ed.). **Bacterial vaccines**. Academic Press, 2012.

GONZÁLEZ, María José *et al.* Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 4, 2017.

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

HEILBERG, Ita Pfeferman; SCHOR, Nestor. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário: ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2003.

HORNER, Rosmari *et al.* Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 38, n. 3, p. 147-150, 2006.

HOOTON, Thomas M.; STAMM, Walter E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics**, v. 11, n. 3, p. 551-581, 1997.

JOHNSON, James R.; RUSSO, Thomas A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International journal of medical microbiology**, v. 295, n. 6, p. 383-404, 2005.

KÄLLENIUS, Gunilla *et al.* P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: identification and chemical characterization of receptors. *Infection*, v. 11, n. 1, p. 61-67, 1983.

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.

KNÖBL, T.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; BOTTINO, J. A.; FERREIRA, A. J. P. F. Detection of *pap*, *sfa*, *afa* and *fim* adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, Washington, v.2, n.2, p. 135-141, 2004

LARA, Flaviane BM *et al.* Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

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.

MAGISTRO, Giuseppe; HOFFMANN, Christiane; SCHUBERT, Sören. The salmochelin receptor *Iron* itself, but not salmochelin-mediated iron uptake promotes biofilm formation in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 4, p. 435-445, 2015.

MANN, Riti *et al.* Metabolic adaptation of uropathogenic *E. coli* in the urinary

tract. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 241, 2017.

MAY, Thithiwat; OKABE, Satoshi. Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 12, p. 3149-3162, 2011.

MEHDIPOUR, S.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G. Detection of citolethal distending toxin (CDT) and cytotoxic necrotizing factor (CNF) genes among *Escherichia coli* isolates from Iranian sheep carcasses. *Comparative clinical pathology* [online], Heidelberg, v.21, p.1683-1688, 2012.

NATARO, James P.; KAPER, James B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

Pereira, A. L., Silva, T. N., Gomes, A. C., Araújo, A. C., Giugliano, L. G., Huang, D., et al. (2010). Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. *BMC Microbiol.* 10:57. doi: 10.1186/1471-2180-10-57

PIRES, Marcelle Cristina da Silva *et al.* Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 643-647, 2007.

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

SALVARANI, S.; TRAMUTA, P.; NEBBIA, P.; ROBINO, P. Occurrence and functionality of cycle inhibiting factor, cytotoxic necrotising factors and cytolethal 25 distending toxins in *Escherichia coli* isolated from calves and dogs in Italy. *Research in Veterinary Science*, Londres, v.92, n.1, p.372-377, 2012.

SPURBECK, Rachel R. *et al.* *Escherichia coli* isolates that carry vat, fyuA, chuA, and

yfcV efficiently colonize the urinary tract. **Infection and immunity**, v. 80, n. 12, p. 4115-4122, 2012.

SINGH, Santosh Kumar; KUMARI, Seema; GUPTA, Minakshi. Detection of AmpC β -lactamase and adherence factors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from aged patients. *Microbial Pathogenesis*, 2016.

SOTO, Sara M. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. **Advances in Biology**, v. 2014, 2014.

STAPLETON, Ann E. Urinary tract infection pathogenesis: host factors. *Infectious disease clinics of North America*, v. 28, n. 1, p. 149-159, 2014.

SUBASHCHANDRABOSE, Sargurunathan; MOBLEY, Harry L. T. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, v. 3, n. 4, 2015.

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

TIBA, Monique Ribeiro *et al.* Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 58, 2009.

WAKIMOTO, Naoko *et al.* Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 5, p. 687-690, 2004.

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