

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação de fatores de virulência e tipagem molecular
das *Escherichia coli* relacionadas a infecções do
trato urinário feminino

Fernando Jorge Schreiner

Caxias do Sul
2006

Fernando Jorge Schreiner

Avaliação de fatores de virulência e tipagem molecular
das *Escherichia coli* relacionadas a infecções
do trato urinário feminino

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
da Universidade de Caxias do Sul,
visando a obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

Co-Orientadores: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray

Prof. Dr. Afonso Luis Barth

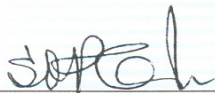
Caxias do Sul
2006

Fernando Jorge Schreiner

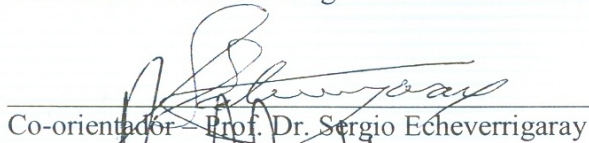
Avaliação de fatores de virulência e tipagem molecular
das *Escherichia coli* relacionadas a infecções do
trato urinário feminino

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
da Universidade de Caxias do Sul,
visando a obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia

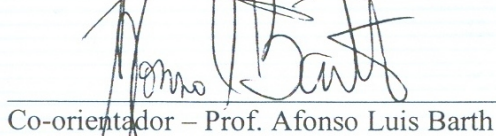
Dissertação aprovada em 15 de dezembro de 2006



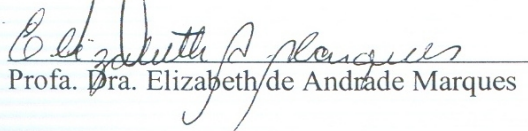
Orientador – Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa



Co-orientador – Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray



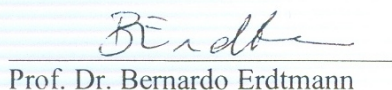
Co-orientador – Prof. Afonso Luis Barth



Prof. Dra. Elizabeth de Andrade Marques



Prof. Dra. Ana Lucia Peixoto de Freitas



Prof. Dr. Bernardo Erdtmann

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S378a Schreiner, Fernando Jorge
Avaliação de fatores de virulência e tipagem molecular das
Escherichia coli relacionadas a infecções do trato urinário feminino
/ Fernando Jorge Schreiner. 2006.
xiv, 71 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa; Co-
orientadores: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray, Prof. Dr. Afonso
Luis Barth.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2006.

1. Mulheres - Infecções do trato urinário. 2. *Escherichia coli*. 3.
I. Título.

CDU: 616.63-022-055.2

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|---|------------------|
| 1. Mulheres – Infecções do trato urinário | 616.63-022-055.2 |
| 2. <i>Escherichia coli</i> | 579.842.1/.2 |

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Carvalho Rodrigues – CRB 10/1411

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Infecção do trato urinário	3
2.2 <i>Escherichia coli</i> uropatogênica	8
2.2.1 Suscetibilidade aos antimicrobianos	13
2.3 Tipagem fenotípica e molecular	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 População-alvo e origem das amostras	17
3.2 Procedimentos	18
3.2.1 Local de realização da pesquisa	18
3.2.2 Urinocultura	20
3.2.3 Exame cultural de fezes	21
3.2.4 Estocagem das bactérias	21
3.2.5 Provas de caracterização dos fatores de virulência das <i>E. coli</i>	21
3.2.5.1 Produção de hemolisina	21
3.2.5.2 Produção de aerobactina	22
3.2.5.3 Ligação do vermelho congo	22
3.2.5.4 Hemaglutinação e expressão da pili 1 e P	23
3.2.5.5 Mobilidade	24
3.2.6 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	24
3.2.7 Tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE)	27
3.3 Questões éticas	29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Fatores de virulência de isolados de <i>E. coli</i>	30
4.2 Distribuição dos fatores de virulência dos isolados de <i>E. coli</i> por paciente nos diversos grupos	35
4.3 Perfis fenotípicos dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	37
4.3.1 Grupo colonização	39
4.3.2 Grupo com ITU recorrente	41
4.3.3 Grupos com ITU comunitária e de internação hospitalar	43
4.4 Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>E. coli</i>	43
4.4.1 Grupos colonização e com ITU recorrente	43
4.4.2 Grupos com ITU comunitária e de internação hospitalar	45
4.5 Análise dos perfis fenotípico, suscetibilidade aos antimicrobianos e genotípico dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	47
4.5.1 Grupo colonização	50
4.5.2 Grupo com ITU recorrente	53
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
7. ANEXO	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Distribuição dos 295 isolados de <i>Escherichia coli</i> por material clínico de 92 pacientes distribuídas em quatro grupos	19
Tabela 2:	Distribuição dos isolados de <i>E. coli</i> de acordo com a expressão dos fatores de virulência por grupo e material clínico	31
Tabela 3:	Relação e porcentagem dos perfis fenotípicos dos 295 isolados de <i>Escherichia coli</i>	38
Tabela 4:	Distribuição dos isolados de <i>Escherichia coli</i> do Grupo de colonização de acordo com o perfil fenotípico	40
Tabela 5:	Distribuição dos isolados de <i>Escherichia coli</i> do Grupo com ITU recorrente de acordo com perfil fenotípico	42
Tabela 6:	Porcentagem de resistência a oito antimicrobianos entre os isolados de <i>Escherichia coli</i> dos Grupos colonização e com ITU recorrente	44
Tabela 7:	Porcentagem de resistência a oito antimicrobianos entre os isolados de <i>Escherichia coli</i> dos Grupos com ITU comunitária e internação hospitalar	46
Tabela 8:	Perfis de suscetibilidade a oito antimicrobianos dos isolados de <i>E. coli</i> .	48,49

Tabela 9:	Distribuição dos isolados de <i>Escherichia coli</i> do Grupo colonização de acordo com o perfil fenotípico, suscetibilidade aos antimicrobianos e PFGE	51
Tabela 10:	Distribuição dos isolados de <i>Escherichia coli</i> do Grupo com histórico de ITU recorrente de acordo com o perfil fenotípico, suscetibilidade e genotípico	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Modelo da patogênese da infecção do trato urinário (ITU) recorrente em mulheres sem anormalidade anatômica e funcional do trato urinário (Finer & Landau, 2004)	7
---	---

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Placa de Ágar Columbia com 5% de sangue de carneiro com isolados de *E. coli* hemolíticos (1 e 2) da urina e não-hemolíticos (3 a 8) de origem intestinal provenientes de um mesmo paciente 25
- Figura 2:** Placa com meio de Luria-Bertani demonstrando um halo branco de crescimento (seta) da cepa LG 1522 ao redor de cada isolado de *E. coli* aerobactina positiva (1 e 2 – urina, 3 a 8 - intestinal) de um mesmo paciente 25
- Figura 3:** Placa Ágar vermelho congo demonstrando colônias de *E. coli* com coloração vermelha (setas) devido a absorção do corante (1 e 2 – urina) de dois pacientes 25
- Figura 4:** **A:** Lâmina mostrando hemaglutinação somente na ausência de manose a 1 %, caracterizando a pili 1 da *E. coli*. **B:** Lâmina mostrando hemaglutinação na ausência e na presença de manose a 1 %, caracterizando a pili P da *E. coli* 25
- Figura 5:** Placa com meio SIM com 1,0 mL % de trifeniltetrazólio 1% mostrando isolados de *E. coli* com mobilidade negativa (cor vermelha na picada) e positiva (todo tubo vermelho) * tubo sem sementeira 26
- Figura 6:** Teste de suscetibilidade a oito antimicrobianos de *E. coli* da urina (esquerda) e de origem intestinal (direita) de um mesmo paciente 26

- Figura 7: Porcentagem de pacientes com isolados de *E. coli* por prova fenotípica e grupo. **A:** Grupo de colonização; **B:** Grupo com ITU recorrente; **C:** Grupos com ITU comunitária e de internação hospitalar 36
- Figura 8: Padrões de PFGE dos isolados de *E. coli* de três casos do Grupo colonização: **coluna** – nº caso (origem do isolado): **1** – 7 (uretral/periuretral); **2** – 7 (intestinal); **3** – 9 (uretral/periuretral); **4** – 9 (intestinal); **5** -10 (uretral/periuretral); **6** -10 (uretral/periuretral); **7**-10 (intestinal) e **8** -10 (intestinal) λ : marcador de peso molecular *lambda ladder* 48,5 Kb 52
- Figura 9: Padrões de PFGE dos isolados de *E. coli* de seis casos do Grupo com ITU recorrente: **coluna** – nº caso (origem do isolado): **1** – 1 (urina); **2** – 1 (intestinal); **3** – 2 (urina); **4** – 2 (intestinal); **5** -3 (urina); **6** -3 (intestinal); **7** -5 (urina); **8** -5 (intestinal); **9** – 7 (urina); **10** – 7 (urina); **11** – 7 (intestinal); **12** – 14 (urina); **13** – 14 (urina) e **14** – 14 (intestinal). λ : marcador de peso molecular *lambda ladder* 48,5 Kb 55

RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU) constituem uma das doenças mais comuns na prática médica geral, respondendo por grande parte dos processos infecciosos comunitários e hospitalares, ocorrendo em indivíduos de todas as faixas etárias, sendo as mulheres normalmente mais acometidas. No presente estudo foram analisados 295 isolados de *Escherichia coli*, provenientes de quatro grupos de mulheres, assim divididos: Grupo colonização; Grupo com ITU recorrente; Grupo com ITU comunitária e Grupo com ITU de internação hospitalar. Estes isolados foram analisados quanto aos fatores de virulência (produção de hemolisina e aerobactina, ligação do vermelho congo, pili 1 e P e mobilidade), a suscetibilidade a oito antimicrobianos e pela tipagem molecular (PFGE) para procurar estabelecer uma associação entre a *E. coli* de origem intestinal com a da ITU. Os resultados demonstraram que a expressão dos fatores de virulência dos isolados de *E. coli* das ITU e os de origem intestinal do grupo Colonização foi extremamente variada e a maioria dos perfis fenotípicos apresentou pelo menos duas características de urovirulência. Foi também verificada uma maior resistência aos antimicrobianos nos grupos de maior exposição a essas drogas, em ordem decrescente (Grupos com ITU de internação hospitalar; ITU recorrente e ITU comunitária). A comparação através da PFGE demonstrou uma concordância clonal entre os isolados de *E. coli* em nível uretral/periuiretral e intestinal de 40,0% (6/15) dos casos do Grupo colonização e de 35,7% (5/14) dos pacientes do Grupo com ITU recorrente (urina e fezes). Comparando os resultados obtidos com a associação dos perfis fenotípicos (fatores de virulência) e de suscetibilidade com os genotípicos, também se obteve 40,0% de coincidência no Grupo colonização e de 42,9% (6/14) para o Grupo com ITU recorrente comparado com 35,7% obtido pela genotipagem.

ABSTRACT

The infections of the urinary tract (UTI) are one of the most common diseases in the general medical practice. They are responsible for an important number of the community and hospital infections affecting individuals of all ages, but with a higher frequency in women. In the present study 295 isolates of *Escherichia coli* were analysed. These isolates were obtained from four clinical groups of women: (1) Colonization group; (2) Recurrent UTI group; (3) Community UTI group; and (4) UTI in hospitalized group. In order to establish a relation between UTI and intestinal *E. coli* the isolates were analysed for the presence of several putative virulence factors (hemolytic activity, aerobactin production, Congo red absorption, motility, and the presence of pili 1 and pili P), the susceptibility against a panel of eight antibiotics, and further characterized by the comparison of their pulse field gel electrophoretic (PFGE) profiles. The results showed that the expression of virulence factors among UTI and intestinal isolates of the colonization group was variable, and most isolates exhibited at least two virulence factors. The antibiotic resistance was higher in the groups with exposure to these drugs, in decreasing order: UTI in hospitalized group, recurrent UTI group, and community UTI group. The comparison of PFGE profiles allowed to confirm the clonal origin of *E. coli* isolates obtained from urinary tract and intestinal samples in 40% (6/15) of the colonization group patients, and 35,7% (5/14) of recurrent UTI group patients. High coincidence was observed between the phenotypic (virulence factors and antibiotic susceptibility) and the genotypic (PFGE) characterization of clonal isolates.

1. INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) constituem uma das doenças mais comuns na prática médica geral, respondendo por grande parte dos processos infecciosos comunitários e hospitalares. Ocorrem em indivíduos de todas as faixas etárias, sendo as mulheres normalmente as mais acometidas.

A *Escherichia coli* é o agente etiológico mais freqüentemente envolvido, sendo responsável pela maioria dos casos de ITU não-complicadas. Essa bactéria pode se originar da microbiota intestinal e atingir a bexiga, podendo chegar aos rins, através da uretra por uma rota ascendente. Na mulher, inicialmente pode ocorrer a colonização na região periuretral e no intróito vaginal, antes de a bactéria ascender à via urinária.

O surgimento da infecção é decorrente da interação entre o patógeno e o hospedeiro, sendo que bactérias uropatogênicas, que usualmente expressam um conjunto de fatores de virulência, podem superar os mecanismos de resistência do hospedeiro, estabelecendo uma ITU. O estudo desses fatores de virulência, tais como os diferentes tipos de fímbrias e de toxinas, os sistemas de captação de ferro e as propriedades da parede celular, entre outros, podem contribuir para o esclarecimento da patogênese da doença.

As infecções do trato urinário podem ser classificadas em recorrentes, quando uma infecção ocorre após a resolução de um episódio anterior, podendo ser uma recidiva ou uma reinfecção. Esta é o modelo de recorrência mais freqüente, sendo definida como a erradicação da bacteriúria, seguida, após intervalo de tempo variável, por uma nova infecção, com um patógeno diferente ou igual; aquela consiste na persistência do agente infeccioso devido provavelmente a uma falha terapêutica ou mesmo pela internalização celular.

Visando contribuir para o conhecimento dos mecanismos da patogênese das infecções do trato urinário que pode resultar em futuras e importantes implicações terapêuticas e profiláticas das ITU, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os fatores de urovirulência, o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e o perfil genotípico das *Escherichia coli* provenientes do trato urinário e compará-las com aquelas isoladas da microbiota intestinal, a fim de estabelecer uma possível origem da infecção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Infecção do trato urinário

O termo “infecção do trato urinário” (ITU) é bastante abrangente, compreendendo uma variedade de entidades clínicas, cuja característica comum é a implantação e a multiplicação de microrganismos, principalmente bactérias, em qualquer segmento do trato urinário, estendendo-se da uretra aos rins, cada qual com a sua sintomatologia e história natural (Warren, 1996).

Anatomicamente, pode envolver somente o trato inferior, indicando infecção localizada na bexiga (cistite) e na uretra (uretrite) ou serem concomitantes com o trato superior, indicando uma invasão bacteriana nos rins, na pelve renal (pielonefrite) e nos ureteres. Clinicamente, pode apresentar-se de forma sintomática ou apenas com bacteriúria, denominada de assintomática (Kunin, 1996; Barros & Thomé, 2004).

A infecção urinária é de elevada prevalência, representando uma parcela importante das consultas ambulatoriais, além de uma importante causa de infecções nosocomiais. Na clínica a sua importância deve-se à elevada morbidade e à associação com condições clínicas de gravidade variável, desde uma condição auto-limitada e benigna, até uma infecção aguda grave, como uroseps, além de insuficiência renal crônica (Sobel & Kaye, 2000; Lewi *et al.* 2004; Kucheria *et al.* 2005).

Em relação às faixas etárias, a incidência de ITU, durante o primeiro ano de vida é aproximadamente igual entre os dois sexos; enquanto que, durante a infância e principalmente na fase pré-escolar, as meninas são mais acometidas, cerca de 10 a 20 vezes mais que os meninos, elevando-se ainda mais a incidência na vida adulta, mantendo-se o

predomínio no sexo feminino. Com o avanço da idade, a diferença na incidência de infecções do trato urinário entre os sexos diminui (Rushton, 1997; Nicolle, 2001).

A despeito do equilíbrio na incidência de ITU entre os sexos em determinadas faixas etárias, as mulheres são normalmente mais acometidas por essa infecção do que os homens. Cerca de 40 a 50 % das mulheres adultas relatam pelo menos um episódio de ITU durante a vida (Warren, 1996; McLaughlin & Carson, 2004).

A infecção pode ser classificada como complicada (com fatores predisponentes) e não-complicada (sem fatores predisponentes). As condições ou fatores predisponentes do hospedeiro, que se associam ao quadro complicado, incluem as seguintes causas: obstrutivas (hipertrofia benigna de próstata, tumores, urolitíase, estenose de junção uretro-piélica e outros); anátomo-funcionais (bexiga neurogênica, refluxo vesicoureteral, cistos renais, divertículos vesicais e outros); metabólicas (insuficiência renal, *diabetes mellitus* e transplante renal); uso de cateter de demora ou qualquer tipo de instrumentação; hospitalização e imunossupressão (Warren, 1996; Sobel & Kaye, 2000).

Entretanto, a maioria das infecções do trato urinário é não-complicada, sendo definida como a presença de bacteriúria na ausência de anormalidades anatômicas ou funcionais do trato urinário, doença metabólica e imunossupressão. Ela é habitualmente adquirida na comunidade, portanto fora do ambiente hospitalar (Giamarellou, 2001; Barros & Thomé, 2004; Stamm, 2006).

Outra classificação é de ITU recorrente que pode representar uma recidiva ou uma reinfeção, e que ocorre em 25 % a 30 % das mulheres com ITU não relacionadas com qualquer anormalidade funcional ou anatômica do trato urinário (Kucheria *et al.* 2005).

As recidivas resultam da falha terapêutica em erradicar o agente da infecção, sendo causadas pelo mesmo microrganismo, geralmente num período menor que três semanas,

estando mais freqüentemente associadas com fatores de risco, tais como: cicatriz renal, cálculo renal, doença cística, nefrite intersticial crônica ou imunocomprometimento; a reinfeção representa o modelo de recorrência muito mais freqüente que a recidiva, sendo definida como a erradicação da bacteriúria, seguida, após intervalo de tempo variável, por nova infecção ou reinvasão do trato urinário com patógeno diferente ou igual (Warren, 1996; Barros & Thomé, 2004).

Segundo Stapleton & Stamm (1997) e McLaughlin & Carson (2004), aproximadamente um terço das mulheres apresentam uma recorrência após um primeiro episódio num período variável de seis meses.

A principal via de infecção responsável pela invasão e disseminação bacteriana do trato urinário é a ascendente, derivando o agente, ao que tudo indica, na maioria dos casos, da microbiota intestinal. No sexo feminino, devido à pequena extensão da uretra e maior proximidade do meato uretral com a vagina e o ânus, as bactérias presentes no trato gastrointestinal e no vestibulo vaginal colonizam a área uretral e periuretral, podendo com maior facilidade ascender ao trato urinário (Kunin, 1996; Nicolle, 2001; McLaughlin & Carson, 2004).

Com exceção da mucosa uretral, o trato urinário é resistente à colonização bacteriana e, na maioria das vezes, é eficiente em eliminar rapidamente qualquer patógeno que alcance a bexiga. Há vários mecanismos de defesa descritos, que podem ser divididos em imunidade natural e em imunidade adquirida. As defesas naturais incluem: o pH ácido e a elevada osmolaridade pelas altas concentrações de uréia e de ácidos orgânicos na urina, que constituem os fatores antibacterianos; o fluxo urinário; a peristalse ureteral e as válvulas competentes no nível das junções ureterovesicais, que evitam a progressão bacteriana até o trato superior; a mucosa do trato urinário; os fatores inibidores da

aderência (mucosa vesical recoberta por uma camada de oligossacarídeos, mucopolissacarídeos e a glicoprotéina de Tamm-Horsfall, sintetizada nos rins e presente na urina); a imunoglobulina A; a lactoferrina e a condição não-secretória dos antígenos do grupo sanguíneo humano ABO, especificamente do grupo P. A imunidade adquirida está relacionada à resposta inflamatória (polimorfonucleares, citocinas) e à resposta sistêmica (humoral, imunidade celular), conforme Warren (1996), Sobel & Kaye, (2000), Schilling *et al.* (2001) e Söderblom *et al.* (2003).

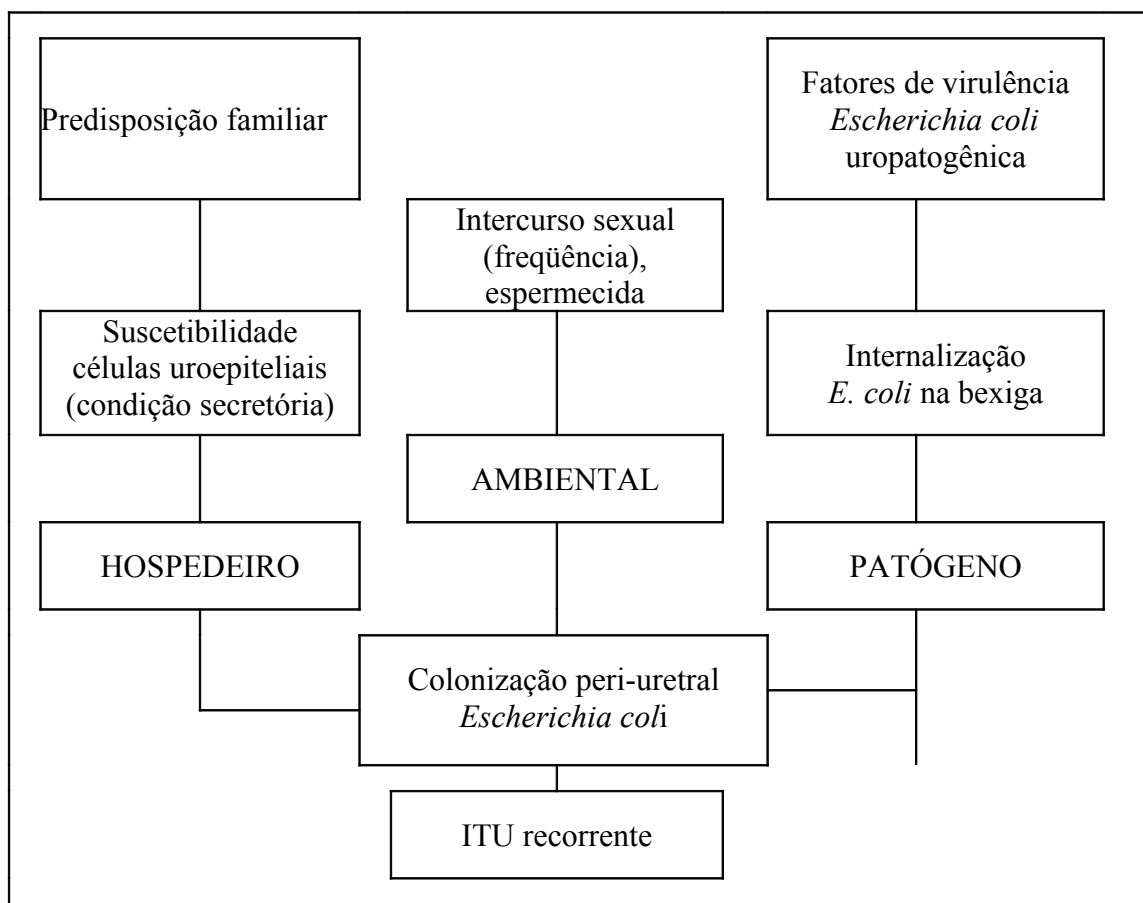
Outros fatores predisponentes à ITU, nas mulheres, incluem a frequência de intercursos sexuais, sendo bem estabelecida a ocorrência de bacteriúria pós-coito, devido ao trauma transvaginal, à uretra, entidade conhecida popularmente como “cistite da lua-de-mel”, além do uso de espermicida que parecem aumentar a colonização periuretral por *Escherichia coli* (Gupta *et al.* 1998).

O motivo pelo qual algumas mulheres são mais predispostas à ITU e desenvolvem infecção recorrente tem sido assunto de intensa pesquisa, envolvendo uma complexa interação entre fatores do hospedeiro e fatores de virulência do patógeno, além daqueles ambientais (Quadro 1) (Evans *et al.* 1981a; Evans *et al.* 1981b; Sandberg *et al.* 1988; Johnson, 1991; Langermann *et al.* 1997; Shrikhande *et al.* 1999; Ruiz *et al.* 2002; Emödy *et al.* 2003; Finer & Landau, 2004; Justice *et al.* 2004; Kau *et al.* 2005; Kucheria *et al.* 2005). Pesquisas recentes têm mostrado a capacidade da *E. coli*, o principal agente etiológico da ITU, de se internalizar na mucosa vesical, tornando-se inacessível aos antimicrobianos (Mulvey *et al.* 2001; Anderson *et al.* 2003; Anderson *et al.* 2004; Justice *et al.* 2004).

Ainda resta uma outra hipótese para o quadro recorrente, contudo remota, que seria a aquisição do microrganismo do parceiro sexual, de acordo com Foxman *et al.* (1997).

Para Bower *et al.* (2005) e Stamm (2006) a soma de conhecimento teórico da interação entre hospedeiro e patógeno pode representar importantes aplicações práticas tanto para o tratamento como para a prevenção através de vacinas.

Quadro 1: Modelo da patogênese da infecção do trato urinário (ITU) recorrente em mulheres sem anormalidade anatômica e funcional do trato urinário (adaptado de Finer & Landau, 2004)



A etiologia bacteriana é demonstrada para a grande maioria dos episódios de ITU, sendo a *Escherichia coli* o patógeno mais isolado (70% a 96%) nas infecções não-complicadas de origem comunitária, seguida de outras bactérias, tais como *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. Em ambiente

hospitalar ou nas ITU relacionadas com anormalidades estruturais do trato urinário, os agentes etiológicos mais frequentes são também as enterobactérias, sendo a *E. coli* observada em cerca de 50% dos casos de internação hospitalar, além de bacilos Gram-negativos não-fermentadores, os enterococos e os estafilococos (Stamm & Norrby, 2001).

Além de infecções do trato urinário, a *E. coli* é agente de infecções intestinais e outras infecção extra-intestinais como bacteremias, sepses, infecções respiratórias e meningite neonatal, em especial em pacientes neonatos ou idosos, ou naqueles com doenças que comprometem a resposta imunológica.

2.2 *Escherichia coli* uropatogênica

Várias propriedades bacterianas têm sido extensivamente estudadas e uma série delas foi relacionada como sendo fator de virulência em infecções do trato urinário. O conceito de bactérias uropatogênicas refere-se a certas cepas que são selecionadas da microbiota intestinal devido à presença de propriedades específicas e que também são responsáveis pela colonização e invasão do trato urinário (Svanborg-Edén, 1986; Johnson, 1991; Oelschlaeger *et al.* 2002).

Os fatores de virulência incluem diferentes tipos de adesinas (fimbriais e não-fimbriais), de toxinas (α -hemolisina, fator necrosante citotóxico), de sistemas de captação de ferro ou sideróforos (aerobactina, enterobactina), hidrofobicidade, além de outros componentes como cápsula, flagelo e lipopolissacarídeo. Assim, os fatores de virulência podem ser divididos em dois grandes grupos, os presentes na superfície bacteriana e aqueles secretados pela bactéria (Svanborg-Edén, 1986; Qadri *et al.*, 1988; Johnson, 1991;

Elliott *et al.* 1998; Silveira *et al.* 2001; Ruiz *et al.* 2002; Emödy *et al.* 2003; Hanna *et al.* 2003; Rubel & Nicastrì, 2003; Stamm, 2006).

As adesinas constituem um dos principais fatores de virulência, pois a adesão da bactéria à célula do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e invasão do trato urinário. Essa aderência é um fenômeno específico de reconhecimento entre o microrganismo e as células do hospedeiro e pode ocorrer através de adesinas não fimbriais ou fimbriais (pili) que são apêndices filamentosos protéicos, localizados na superfície da célula bacteriana, que se ligam a receptores correspondentes na superfície de diferentes células do hospedeiro, tais como eritrócitos, células epiteliais de vários tecidos, incluindo as do trato urinário e as células do sistema imune (Johnson, 1991; Emödy *et al.* 2003, Roche *et al.* 2005).

Uma variedade de adesinas tem sido identificada em cepas uropatogênicas de *Escherichia coli*; entre elas, duas classes gerais de pili (fimbrias), baseadas na sua atividade hemaglutinante: pili tipo 1, que tem a sua aglutinação com eritrócitos inibida pela D-manose, também designadas de manose-sensíveis (MS) e pili P que não tem a hemaglutinação inibida pela D-manose, chamadas de manose resistentes (MR), de acordo com Duguid *et al.*(1955) e Johnson (1991).

As fimbrias tipo 1 são comumente encontradas em diferentes enterobactérias, incluindo a *E. coli* uropatogênica. Essa fimbria é responsável pela ligação da bactéria a uma variedade de receptores formados por glicoproteínas, contendo manose, presentes nas células epiteliais do trato urinário, assim como de outros sítios, como o trato gastrointestinal e o intróito vaginal, o que sugere que a adesão tenha um papel importante na colonização do epitélio e, dessa forma, na virulência dessas bactérias (Svanborg-Edén *et al.* 1976; Leffler & Svanborg-Edén, 1981; Buchanan *et al.* 1985; Johnson, 1991). Outros

receptores, além dos eritrócitos, incluem as células inflamatórias e a proteína de Tamm-Horsfall, que podem exercer um efeito protetor, impedindo a aderência da bactéria (Bastos *et al.* 2001).

O segundo tipo de fimbrias, as MR, constitui um grupo heterogêneo, cujas estruturas receptoras são variadas. Noventa por cento delas reconhecem como elemento mínimo receptor, o dissacarídeo α -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal, que está presente em todos os três glicosfingolípídeos, associados ao grupo sanguíneo humano P. Por essa razão, são conhecidas como fimbria P (Korhonen *et al.* 1982). O grupo sanguíneo P ocorre na população em cinco diferentes fenótipos, identificados pela combinação dos antígenos P, P1 e PK, sendo raro o fenótipo pp (< 1%), no qual estão ausentes todos os antígenos (Kallenius *et al.* 1981). Esses receptores estão presentes nos eritrócitos e em outros tecidos, sendo predominantes nas células renais (Johnson, 1991).

Estas fimbrias são importantes na ascensão da bactéria durante a infecção urinária, tendo sido encontradas em 80 % dos isolados de *E coli* de pielonefrites não-complicadas; em 50 % das pielonefrites com complicação e em 37 % das cistites (Sandberg *et al.* 1988).

O íon ferro é um importante fator para o desenvolvimento bacteriano, o que faz com que muitos microrganismos possuam mecanismos específicos para obtê-lo e transportá-lo. De acordo com Johnson (1991) e Neilands (1995), em virtude das baixas concentrações de ferro na urina (150 μ g/24horas) assim como em outros fluídos e tecidos, ocorre, entre o hospedeiro e o microrganismo, uma competição que pode ser considerada como uma “batalha de agentes quelantes”. Neste contexto, algumas cepas de *E. coli* desenvolveram várias estratégias para o seqüestro de ferro, sendo a mais eficaz a produção de sideróforos ou compostos ligadores de ferro como a aerobactina (Johnson, 1991; Neilands, 1995; Emödy *et al.* 2003).

Foi verificado que cerca de 75% das *E. coli*, responsáveis por sepses, produzem aerobactina, sugerindo que essa propriedade possa ser importante na habilidade de a bactéria atingir a corrente circulatória (Montgomerie *et al.* 1984). Isso é especialmente interessante, pois isolados de *E. coli* de pacientes com ITU, também produzem aerobactina e a infecção do trato urinário é a fonte mais comum de *E. coli* nas sepses. Desta maneira, a produção de aerobactina, poderia ser um dos fatores de virulência na determinação da progressão de uma ITU, uma vez que as bactérias produtoras de aerobactina têm vantagens de crescimento em condições de baixo teor de ferro como a urina (Carbonetti *et al.* 1986; Johnson, 1991).

Um método alternativo para a obtenção de ferro pelas bactérias, além da produção de aerobactina, é a lise das hemácias através da toxina denominada de α -hemolisina. Verificou-se que as cepas de *E. coli* das infecções urinárias, incluindo pielonefrites e outras infecções extraintestinais, são hemolíticas (Evans *et al.* 1981b; Elliott *et al.* 1998). Também foi verificado que a α -hemolisina tem ação sobre outras células, tais como leucócitos, células endoteliais e renais, interferindo assim na função fagocitária e contribuindo para a nefropatogenicidade em modelos animais (Linggood & Ingram, 1982; Keane *et al.* 1987; Rubel & Nicastrì, 2003).

Algumas *E. coli* uropatogênicas produzem colicinas que são toxinas antibacterianas, que podem proporcionar vantagens para que as bactérias proliferem entre outras bactéria da microbiota normal no sítio de colonização (Johnson, 1991).

Outros fatores de virulência localizados na superfície bacteriana da *E. coli* incluem o antígeno capsular (K) que exerce proteção contra a fagocitose e o lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina que aumenta a resposta inflamatória do hospedeiro. As cepas de *E. coli* uropatogênicas compreendem vários sorogrupos, com base no seu antígeno somático

(O) e vários sorotipos de acordo com o antígeno capsular (K) e o antígeno flagelar (H) (Stamm, 2006).

Segundo Emödy *et al.*, (2003), a mobilidade, devido ao flagelo, contribui para a virulência do *Proteus mirabilis* na ascensão da ITU, sendo provável o seu envolvimento na invasão tecidual. A mobilidade deve aumentar a habilidade da *E. coli* a respostas adaptativas de estímulos ambientais; entretanto, ainda não está bem estabelecido o seu papel na patogênese da doença.

No final da década de 1960, Ordal citado por Johnson & Chilton, (1966) observou que bactérias patogênicas (*Chondrococcus columnaris*) de peixes podiam ser corados com um corante ácido, tal como, o vermelho congo. Essa propriedade de hidrofobicidade tem sido investigada como possível indicador de virulência. Mais recentemente, outros pesquisadores verificaram que a ligação ao corante estava relacionada ao aumento da capacidade de invasão dos tecidos do hospedeiro em modelos experimentais com *E. coli*, espécies de *Salmonella*, cepas de *Shigella flexneri* e em *Yersinia pestis* (Maurelli *et al.* 1984; Berkhoff & Vinal, 1985; Qadri *et al.* 1988). Além disso, a técnica de absorção do vermelho congo tem sido utilizada como marcador da capacidade de formar biofilme em diferentes espécies bacterianas como *Staphylococcus aureus* e *E. coli* uropatogênicas (Silveira *et al.* 2001; Petrelli *et al.* 2006).

2.2.1 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos tem se tornado um problema de saúde pública. O aumento nas taxas de resistência em espécies normalmente sensíveis, assim como, o aumento da prevalência das espécies mais resistentes, tem limitado a escolha da terapia empírica e ocasionado maior morbidade, mortalidade e custos (Jones & Pfaller, 1998).

O estudo realizado pelo Programa Mundial e Longitudinal de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos, SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), avaliou 246 amostras de *Escherichia coli* de origem hospitalar isoladas de ITU em seis países da América Latina (Brasil, Argentina, Chile, Uruguai, Colômbia e México). Foram verificadas taxas de resistência para os antimicrobianos beta-lactâmicos numa variação de 0,4% a 57,3%; para as quinolonas de 15,4 % a 17,1 %; para os aminoglicosídeos de 0,4 % a 6,5 %; para a nitrofurantoína, 9,8 % e o trimetoprim-sulfametozaxol, 56,9 % (Sader *et al.*, 1999).

Embora o fenômeno de aumento da resistência esteja ocorrendo com maior intensidade no ambiente hospitalar, ele está extrapolando gradativamente para a comunidade, de acordo com Tenover (2001) e Sahm *et al.* (2001). A emergência de isolados *E. coli* com fenótipos de multiresistência, envolvendo co-resistência para quatro ou mais famílias diferentes de antimicrobianos, tem sido reportada tanto entre isolados clínicos de humanos como em isolados obtidos de animais e alimentos (Karlowsky *et al.* 2003; Sáenz *et al.* 2004).

A resistência das enterobactérias aos antimicrobianos da comunidade está aumentando, sendo tanto maior o isolamento de microrganismos resistentes quanto maior

for o uso destas drogas pela população (Naber, 2000; Gupta *et al.* 2001; Richard *et al.*, 2001).

Desta maneira, o uso racional de antimicrobianos constitui uma das medidas mais eficazes para conter o aumento da resistência bacteriana. E para tanto, é necessário o conhecimento e avaliação periódica do perfil de suscetibilidade dos patógenos, uma vez que ele é muito variável de país para país, de cidade para cidade e inclusive de hospital para hospital (Sader *et al.* 1999). Para Gupta *et al.* (2001), estudos da suscetibilidade dos uropatógenos deveriam distinguir isolados urinários oriundos de mulheres adultas com ITU de origem comunitária que representam, na grande maioria, ITU não-complicada, daqueles isolados de homens, crianças ou pacientes hospitalizados, os quais apresentam ITU complicada.

2.3 Tipagem fenotípica e molecular

Entende-se por tipagem epidemiológica a caracterização mais detalhada de um microrganismo com o objetivo de evidenciar a sua provável relação genética com outros isolados clínicos pertencentes à mesma espécie (Sader *et al.* 1995).

A utilização de métodos laboratoriais de caracterização fenotípica e genotípica dos patógenos para estabelecer os seus graus de relação genética, são de extrema importância para as investigações epidemiológicas. Desta maneira, a tipagem pode auxiliar na identificação de surtos e fontes de infecção, na diferenciação de modos de transmissão ou disseminação do patógeno e na orientação das medidas a serem adotadas nos programas de controle de infecção (Sader *et al.* 1995; Weber *et al.* 1997).

Os métodos de tipagem epidemiológica são divididos em fenotípicos e genotípicos. Devido aos problemas com relação à tipabilidade (capacidade do método de proporcionar resultados bem definidos para cada um dos isolados), à reprodutibilidade (habilidade do sistema em produzir resultados idênticos, quando um mesmo isolado é tipado diversas vezes) e ao poder discriminatório (capacidade da técnica em diferenciar diferentes cepas de uma mesma espécie, principalmente quando elas são muito parecidas), diversos métodos genotípicos foram desenvolvidos nas últimas décadas (Sader *et al.* 1995).

Métodos fenotípicos incluem os métodos clássicos, tais como, perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, perfil bioquímico, sorotipagem (antígenos bacterianos somáticos e flagelar), fagotipagem (susctibilidade à lise de bactérias por vírus), perfil de sensibilidade a bacteriocinas e análise de proteínas (Pfaller & Herwaldt, 1997; Koneman *et al.* 2001).

Em relação aos genotípicos existe uma variedade de métodos baseados na análise plasmidial, cromossômica ou ribossômica. A maioria dos métodos utiliza técnica de eletroforese, que está baseada na separação de moléculas como ácidos nucléicos pela diferença de potencial entre dois eletrodos em uma matriz polimerizada como agarose ou poliacrilamida (Pfaller & Herwaldt, 1997; Albeit, 1999).

O método que tem sido considerado de referência para a identificação da relação clonal entre os isolados é a eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE) (*pulsed-field gel electrophoresis*), desenvolvida por Schwatz e Cantor em 1984. A técnica da PFGE apresenta ótimo poder discriminatório, reprodutibilidade e facilidade de interpretação, e por isso é considerada o padrão ouro para a tipagem de microrganismos (Tenover *et al.* 1995; Pfaller, 2001).

Esse método permite a separação de fragmentos de DNA bacteriano após a digestão com enzimas de restrição que reconhecem poucos sítios, gerando assim, grandes fragmentos de DNA (10-800 Kb), os quais não poderiam ser separados eficientemente por eletroforese convencional. Na PFGE, a orientação do campo elétrico através do gel é modificada periodicamente, permitindo que fragmentos de DNA de magnitude de megabases sejam separados efetivamente por diferença de tamanho (Pfaller & Herwaldt, 1997; Albeit, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População-alvo e origem das amostras

Foram incluídas no estudo 92 mulheres divididas em quatro grupos, conforme segue:

Primeiro grupo - Grupo Colonização

Quinze mulheres que estavam colonizadas por *E. coli* tanto na região uretral/periuretral como na intestinal foram selecionadas após a pesquisa em 44 voluntárias da comunidade de Caxias do Sul que não apresentavam histórico de ITU recente e nem recorrente e que não estavam fazendo uso de antimicrobianos. O material utilizado na pesquisa foi a primeira porção do jato de urina e fezes. Além disso, para controle, como condição para pertencer a este grupo, foi realizada uma urinocultura de rotina com jato médio com resultado obrigatoriamente negativo.

Segundo grupo - Grupo com histórico de ITU recorrente

Quatorze mulheres com atendimento em clínica médica de Caxias do Sul, com sintomas de infecção do trato urinário, histórico de infecção recorrente (no mínimo dois a três episódios por ano) e sem causas predisponentes identificadas, foram selecionadas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Médica Humana (DCBM/UCS) para a realização de exames cultural de urina e de fezes.

Terceiro grupo - Grupo com ITU comunitária

Foram obtidos 48 isolados de *E. coli* (um por paciente) provenientes de urinocultura de rotina de pacientes com ITU comunitária que procuraram o serviço do

Laboratório de Microbiologia Médica Humana (DCBM/UCS) e Laboratórios de Análises Clínicas de Caxias do Sul com solicitação médica para exame de urinacultura de rotina.

Quarto grupo - Grupo com ITU com internação hospitalar

Foram obtidos 15 isolados de *E. coli* (um por paciente) oriundas de urinoculturas de rotina de pacientes com internação hospitalar por motivos variados no Hospital Geral de Caxias do Sul, realizadas no Laboratório de Microbiologia deste hospital.

Assim, do total das 92 pacientes envolvidas neste estudo foram obtidos 295 isolados de *E. coli*, nos anos de 2005 e 2006, os quais foram distribuídos conforme se observa na Tabela 1.

3.2 Procedimentos

3.2.1 Local de realização da pesquisa

As amostras clínicas foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia Médica Humana do Departamento de Ciências Biomédicas (DCBM) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade de Caxias do Sul e lá processadas.

Tabela 1: Distribuição dos 295 isolados de *Escherichia coli* por material clínico de 92 pacientes distribuídas em quatro grupos.

Grupo colonização (n = 15)			Grupo com histórico de ITU recorrente (n = 14)			Grupos com ITU		Total geral <i>E. coli</i>
Uretral e peri-uretral ¹	Intestinal ²	Total <i>E. coli</i>	Urina ¹	Intestinal ²	Total <i>E. coli</i>	Comunitária (n ^a = 48)	Internação hospitalar (n ^a = 15)	
			Urina ³			Urina ³	Urina ³	
30	90	120	28	84	112	48	15	295

ITU: infecção do trato urinário; n: número de pacientes; n ^a: número de pacientes semelhante ao número de isolados de *E. coli*; ^{1,2 e 3}: dois, seis e um isolados de *E. coli* por amostra, respectivamente.

3.2.2 Urinocultura

A cultura de urina para fins de diagnóstico de ITU foi processada conforme as técnicas de rotina, ou seja, a partir de amostras de jato médio em frasco estéril, após a higienização da região genital. Os isolados de *E. coli* do grupo colonização foram obtidos a partir da cultura do primeiro jato de urina, sendo considerado que essas representam colonização uretral/periuretral.

A urinocultura de rotina foi realizada após a homogeneização do jato médio de urina, e semeada 0,001mL de urina com uma alça calibrada em meios de Ágar MacConkey (Merck®) e Ágar Columbia com 5 % de sangue de carneiro (bioMérieux ®) e incubadas numa estufa de $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 18 a 24 horas.

O primeiro jato de urina proveniente de mulheres do grupo de colonização foi enriquecido em caldo MacConkey (Difco ®) por 24 horas a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, realizado um isolamento por esgotamento do inóculo em um meio de Ágar MacConkey (Merck®).

Após a identificação dos isolados de *E. coli* utilizando provas bioquímicas convencionais (fermentação de glicose e lactose, produção de indol, utilização de citrato, vermelho de metila, Vogues-Proskauer), dois isolados por amostra clínica foram reservados para posteriores testes (Farmer, 2003).

3.2.3 Exame cultural de fezes

Os isolados de *E. coli* intestinais foram obtidos por esgotamento do inóculo em Ágar MacConkey, a partir da suspensão de uma alçada de fezes em um ml de solução fisiológica esterilizada. Após incubação a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 18 a 24 horas, foram escolhidas arbitrariamente seis colônias lactose positivas por material clínico, as quais foram reservadas após caracterização bioquímica. A escolha de seis colônias bacterianas das fezes foi feita seguindo os resultados obtidos por Lidin-Janson *et al.* (1978) que mostraram que a probabilidade de uma colônia de *E. coli* isolada das fezes representar a cepa predominante era de 86,0 %; duas de 94,0 %; três de 97,0 %, quatro de 99,0 % e cinco de 99,3 %.

3.2.4 Estocagem das bactérias

Todos os isolados de *E. coli* foram rotulados, identificados e estocados a uma temperatura de -20°C e -70°C em meio *skim milk* contendo 20 % (pes/vol) de leite desnatado em pó dissolvido em água destilada e autoclavado a 110°C por 20 minutos (Reiner & Carroll, 2003).

3.2.5 Provas dos fatores de virulência das *E. coli*

3.2.5.1 Produção de hemolisina

A produção de hemolisina foi realizada utilizando 10 μL de uma cultura em caldo LB (Luria Bertani), incubado por 18 a 24 horas a $35\pm 1^\circ\text{C}$, sendo semeado em gota numa

placa de Petri contendo Ágar Columbia com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux ®). Essas placas foram incubadas a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 18 a 24 horas, sendo a produção de hemolisina verificada pela presença de um halo de hemólise ao redor das colônias após a incubação (Silveira *et al.*, 2001) (Figura 1).

3.2.5.2 Produção de aerobactina

A produção de aerobactina pelos isolados de *E. coli* foi verificada utilizando o crescimento do isolado em caldo LB (meio de Luria-Bertani), contendo $200\ \mu\text{M}$ de α - α -dipiridil e incubado a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas sem agitação. Posteriormente, $10\ \mu\text{L}$ da cultura foram semeados em orifícios no meio LB previamente incorporado com a cepa de *E. coli* LG 1522 (cedida pelo Dr. Wanderley Dias da Silveira, Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP) que possui fenótipo aerobactina deficiente, devido a uma mutação no gene da aerobactina, mas sem afetar os genes para os receptores da mesma. As placas de Petri foram mantidas a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas e a produção de aerobactina foi visualizada pela presença de um halo de crescimento esbranquiçado da cepa de *E. coli* LG 1522 ao redor dos orifícios, segundo metodologia adotada em Silveira *et al.* (2001) (Figura 2).

3.2.5.3 Ligação do vermelho congo

A ligação do vermelho congo foi realizada segundo descrição de Berkhoff & Vinal (1985). Os isolados de *E. coli* foram semeados por 24 horas a $35\pm 1^\circ\text{C}$ em meio LB e posteriormente semeados pelo método de esgotamento do inóculo em Ágar vermelho congo (TSB suplementado com 0,03% de vermelho congo e 0,15% de sais biliares) e

incubadas por 24 horas a 37°C. A *E. coli* vermelho congo positiva foi identificada pela coloração vermelha da colônia (Figura 3).

3.2.5.4 Hemaglutinação e expressão da pili 1 e P

A expressão da pili do tipo 1 ou tipo D-manose sensível (MS) foi determinada pela aglutinação de hemácias humanas do tipo A sem o antígeno P, cedidas pelo Hemocentro de Caxias do Sul, preparadas em diluições de 1:4 com tampão fosfato (PBS), pH 7,2, com e sem D-manose 1 %. Os isolados de *E. coli* foram cultivados por 18 horas a 35±1°C em Ágar CFA (*Colonization Factor Antigen* - ácido casamino 1%, extrato de levedo 0,15%, MgSO₄ 0,005%, MnCl₂ 0,0005% e ágar 2%, pH de 7,4). Uma alçada do crescimento bacteriano foi retirada e misturada com 20µL (uma gota) da suspensão de hemácias numa lâmina de vidro. O resultado positivo correspondeu a uma aglutinação instantânea após um minuto ou após observação por mais um minuto com a lâmina sobre uma superfície de gelo. Foi considerada como pili 1, àquele isolado cuja hemaglutinação foi inibida na presença de manose (Evans *et al.* 1979). A cepa de *E. coli* ORN 115 (cedida pelo Dr. Wanderley Dias da Silveira, Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP) foi utilizada como controle positivo de pili 1.

A expressão da pili P ou D-manose resistente (MR) foi determinada com sangue humano com antígeno P, com e sem a adição de D-manose 1 %, realizado em temperatura ambiente e sobre o gelo. Foi considerada com pili do tipo P aquele isolado que se aglutinou na ausência e presença de manose (Figura 4A e 4B).

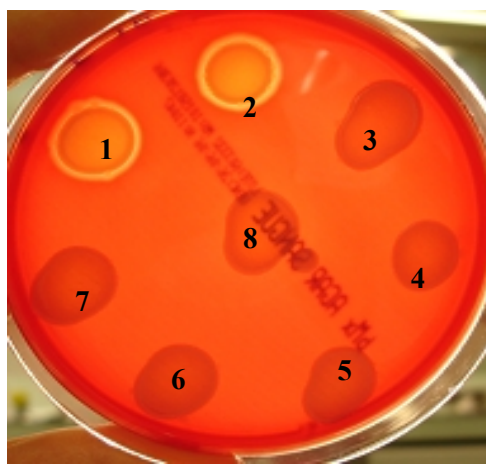
3.2.5.5 Mobilidade

A mobilidade foi verificada com semeadura em picada em meio de SIM (H₂S, indol e mobilidade) adicionado com 10 mL por litro de uma solução de trifeniltetrazólio a 1% e incubado a 35±1°C por um período de 24 a 72 horas. A presença de desenvolvimento de cor vermelha em todo o meio de cultura evidenciou mobilidade positiva, enquanto que, somente na extensão da picada caracterizou uma mobilidade negativa (Figura 5).

3.2.6 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os isolados de *E. coli* foram avaliados quanto à sensibilidade a oito antimicrobianos mais frequentemente utilizados no tratamento da ITU, pela técnica de disco-difusão, Kirby-Bauer, conforme recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (2005). Na superfície do Ágar de Müller-Hinton, após a semeadura do inóculo na escala de turbidez de 0,5 MacFarland, foram dispensados discos com antimicrobianos (Oxoid ®), sendo a aferição dos halos de inibição realizada após incubação a 35°C por um período de 16 a 18 horas, e a categorização das amostras, isto é, a interpretação dos testes em resistentes ou sensível, realizada de acordo com a padronização recomendada pelo CLSI (2005). Foram testados os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico, ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefalotina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacin e sulfametoxazol-trimetoprim (Figura 6). Foi realizado controle de qualidade utilizando cepas padrões da “American Type Culture Collection” (ATCC) de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Foi estabelecido, como critério para o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, isolados encontrados em cada paciente nos dois sítios anatômicos (uretral/periuretral ou



o mesmo perfil fenotípico relacionado às provas de pili I e P e mobilidade.

2

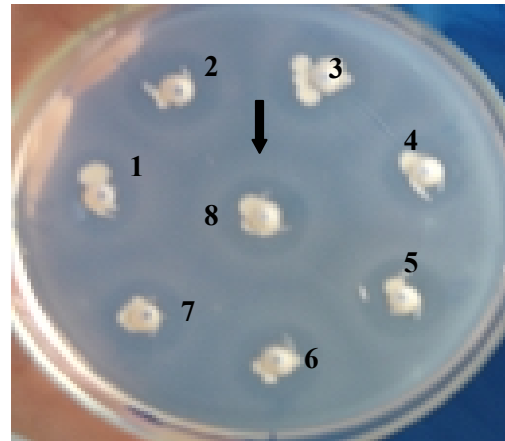


Figura 1: Placa de Ágar Columbia com 5% de sangue de carneiro com isolados de *E. coli* hemolíticos (1 e 2) da urina e não-hemolíticos (3 a 8) de origem intestinal provenientes de um mesmo paciente

Figura 2: Placa com meio de Luria-Bertani demonstrando um halo branco de crescimento (seta) da cepa LG 1522 ao redor de cada isolado de *E. coli* aerobactina positiva (1 e 2 – urina, 3 a 8 - intestinal) de um mesmo paciente

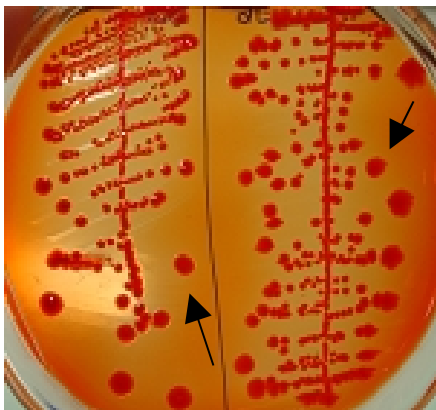


Figura 3: Placa Ágar vermelho congo demonstrando colônias de *E. coli* com coloração vermelha (setas) devido a absorção do corante (1 e 2 – urina) de dois pacientes

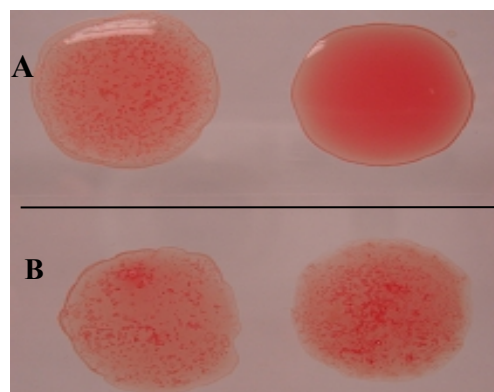


Figura 4: **A:** Lâmina mostrando hemaglutinação somente na ausência de manose a 1 %, caracterizando a pili 1 da *E. coli*. **B:** Lâmina mostrando hemaglutinação na ausência e na presença de manose a 1 %, caracterizando a pili P da *E. coli*

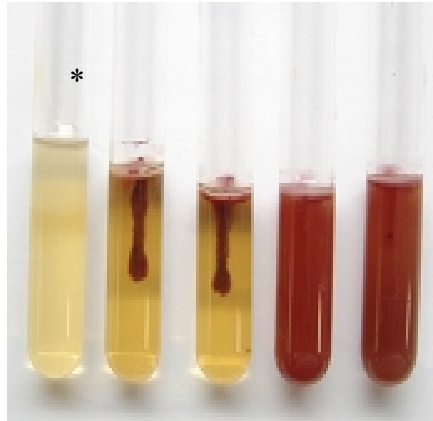


Figura 5: Placa com meio SIM com 1,0 mL de trifeniltetrazólio 1% mostrando isolados de *E. coli* com mobilidade negativa (cor vermelha na picada) e positiva (todo tubo vermelho) * tubo sem sementeira

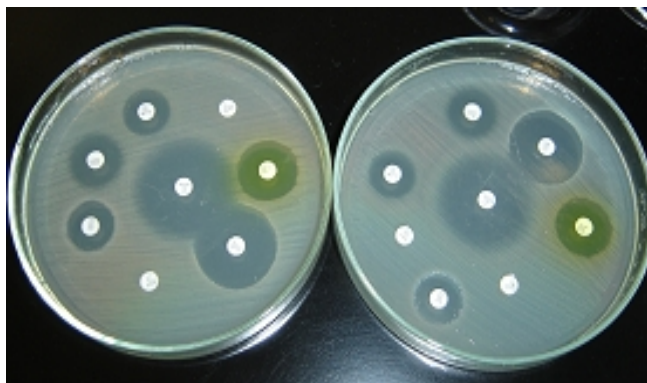


Figura 6: Teste de suscetibilidade a oito antimicrobianos de *E. coli* da urina (esquerda) e de origem intestinal (direita) de um mesmo paciente

3.2.7 Tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Para a determinação da similaridade genética dos isolados de *E. coli* uropatogênicas, foi empregado o método de macrorestrição de DNA, seguida de eletroforese em campo pulsado. Foi estabelecido, como critério para a análise genotípica, isolados encontrados em cada paciente nos dois sítios anatômicos (uretral/ periuretral ou urina e fezes) que apresentaram um mesmo perfil fenotípico relacionado às provas de hemólise, aerobactina, vermelho congo, pili 1 e P e mobilidade.

Isolados de *E. coli* foram cultivados em 8mL de caldo TSB e incubados a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 18 a 24 horas. Após esse período, essa cultura foi centrifugada por 15 minutos e, em seguida, desprezado o sobrenadante. O centrifugado foi resuspenso em 1mL de solução salina e transferido para um tubo de centrífuga de peso conhecido. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e desprezado. Os tubos foram pesados novamente para se determinar o peso do centrifugado e a seguir adicionado de um volume de solução salina equivalente em microlitros igual ao peso do centrifugado em miligramas. Após a homogeneização, 5 μL dessa suspensão de células foram misturados com 300 μL de tampão TE (Tris 100mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM) e 340 μL de agarose 2 % (*low melting point*), colocadas em moldes apropriados para a formação dos blocos de géis contendo o microrganismo e refrigerados por cerca de 30 minutos. Os blocos foram incubados com 1,5 mL de tampão de proteólise (EDTA 0,5M; pH 9,5; lauril sarcosil 1,0 %) e 38 μL de proteinase K (50mg/mL) para a lise e liberação do DNA, por 24 horas a 57°C . Após este período de incubação, os blocos foram lavados cinco vezes com solução tampão TE por cerca de 20 minutos cada vez e armazenados em temperatura de refrigeração nessa solução, até serem submetidos à digestão enzimática e posterior eletroforese.

Para a realização da digestão, menos de um terço de cada bloco (aproximadamente 2,0 mm x 5,0 mm) foi incubado por 15 horas a 37°C com tampão de restrição contendo 10 U/ μ L da enzima *SpeI*. Os blocos foram inseridos em um gel de agarose a 1,2% e as frações de DNA resultantes foram separadas através do sistema CHEF- DRIII (Bio-Rad, Richmond). O tempo de migração foi de 21 horas com um pulso inicial de 5s e final de 25s, numa solução tampão TBE 0,5x (Tris 0,891 M; ácido bórico 0,90 M; EDTA 0,019 M) acrescido de 100 μ L de tiouréia 0,5 M por litro de tampão. A eletroforese foi realizada numa temperatura de 14°C, utilizando uma corrente elétrica de 5,9 V/cm e um ângulo de 120°. Foi usado como marcador de peso molecular, o fago *Lambda Ladder* 48,5 Kb. O DNA, após a separação, foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) por aproximadamente 40 minutos e descorado em água destilada por mais 40 minutos, sendo a seguir visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (UV).

Os perfis de macro-restrição do DNA foram comparados visualmente e a relação entre os isolados estabelecida utilizando os critérios baseados no número de eventos genéticos necessários para provocar uma alteração de bandas, que classificam os isolados em: distintos, possivelmente relacionados, provavelmente relacionados e indistinguíveis. São considerados isolados distintos, aqueles que apresentaram sete ou mais bandas discordantes; isolados possivelmente relacionados aqueles com quatro a seis bandas diferentes; provavelmente relacionados com até três bandas diferentes e isolados indistinguíveis, aqueles com o mesmo perfil de macrorestrição (Tenover *et al.* 1995).

3.3 Questões éticas

O protocolo da presente investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Caxias do Sul. Foi elaborado um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) para as pacientes incluídas no estudo, segundo determinações estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde na resolução nº196/1996. As amostras clínicas foram posteriormente esterilizadas em autoclave a uma temperatura de 121°C por 30 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é entendida como uma ocorrência, em que fatores de virulência bacteriana sobrepujam os mecanismos de resistência do hospedeiro (Sobel & Kaye, 2000).

Abstraindo as múltiplas condições que contribuem para a suscetibilidade do hospedeiro à ITU, foram focalizados neste estudo alguns fatores de virulência que caracterizam a *Escherichia coli* como sendo uropatogênica, tornando-a capaz de vencer a resistência do hospedeiro (Johnson, 1991; Emödy *et al.* 2003).

No total, foram analisados 295 isolados de *Escherichia coli* provenientes de mulheres adultas, os quais foram divididos em quatro grupos: Grupo colonização (120 isolados de colonização uretral/periuretral e intestinal), perfazendo o total de 15 casos; Grupo com histórico de ITU recorrente (112 isolados provenientes da urina e fezes), perfazendo o total de 14 casos; Grupo com ITU de origem comunitária (48 isolados da urina) de 48 casos e; Grupo com ITU de internação hospitalar (15 isolados da urina) de 15 casos.

4.1 Fatores de virulência de isolados de *E. coli*

A Tabela 2 mostra a distribuição dos 295 isolados de *E. coli* de acordo com a expressão dos fatores de virulência por grupo de mulheres e material clínico analisado.

Tabela 2: Distribuição dos isolados de E. coli de acordo com a expressão dos fatores de virulência por grupo e material clínico

Fatores de virulência	Grupo colonização (n=120)		Grupo com ITU recorrente (n=112)		Grupo com ITU comunitária	Grupo com ITU internação hospitalar	Total (n=295) n %
	Uretral e periuretral (n=30)	Intestinal (n=90)	Urina (n=28)	Intestino (n=84)	Urina (n=48)	Urina (n=15)	
	n %	n %	n %	n %	n %	n %	
Hemolisina	8 (26,7)	14 (15,6)	7 (25,0)	10 (11,9)	12 (25,0)	3 (20,0)	54 (18,3)
Aerobactina	4 (13,3)	24 (26,7)	14 (50,0)	62 (73,8)	19 (39,6)	4 (26,7)	127 (43,1)
Vermelho congo	30 (100,0)	90 (100,0)	28 (100,0)	78 (92,9)	48 (100,0)	15 (100,0)	283 (95,9)
Pili 1	14 (46,7)	47 (52,2)	13 (46,4)	39 (46,4)	11 (22,9)	3 (20,0)	127 (43,1)
Pili P	5 (16,7)	8 (8,9)	8 (28,6)	11 (13,1)	14 (29,2)	7 (46,7)	53 (18,0)
Mobilidade	30 (100,0)	80 (88,9)	25 (89,3)	70 (83,3)	34 (70,8)	13 (86,7)	252 (85,4)

Entre as provas estudadas, a fixação do vermelho congo mostrou-se de difícil interpretação devido à dificuldade de estabelecer o limite de positividade, de tal maneira que 95,9% dos isolados foram positivos. Uma alternativa para esse teste seria a avaliação quantitativa da absorção do corante, segundo Qadri *et al.* (1988), embora até o momento não foram estabelecidos definitivamente os limites para essa prova. A ligação do vermelho congo se deve a presença de poli-N-acetilglicosamina que confere propriedades de adesão e invasão dos microrganismos patogênicos (Berkhoff & Vinal, 1985; Wang *et al.* 2004; Petrelli *et al.*, 2006).

As demais provas apresentaram resultados claramente interpretáveis. A maioria dos isolados, ou seja, 85,4% (252/295) mostrou mobilidade positiva com uma variação de 70,8% a 89,3% para os isolados de *E. coli* de ITU (Grupos com ITU recorrente, comunitária e de internação hospitalar), comparados com 88,9% a 100,0% entre os isolados de pessoas sadias do Grupo colonização (Tabela 2).

Relatos de trabalhos recentes como os de Lane *et al.* (2005) e Xie *et al.* (2006), sugerem que o flagelo, um mediador da mobilidade e da quimiotaxia, pode não ser absolutamente necessário para a virulência, mas deve contribuir para o aumento do deslocamento ascendente no trato urinário das *E. coli* uropatogênicas, bem como para a habilidade de estabelecer a colonização periuretral e vaginal.

Para a prova de hemólise, foi verificado que 18,3% (54/295) dos isolados foram hemolíticos com uma variação 11,9% a 26,7%. Entre os pacientes com ITU observou-se que 20,0% a 25,0% dos isolados produziram hemolisina, comparados com 15,6% a 26,7% entre os isolados de pessoas sadias (Tabela 2).

Embora tenham sido verificadas baixas taxas de isolados hemolíticos neste trabalho, valores entre 60,0% a 85,0% têm sido observados em isolados de *E. coli* entre

pacientes com pielonefrite, em contraste com controles sadios que exibiram 5,0% a 29,0% de isolados hemolíticos de fezes (O'Hanley, 1990). Segundo Johnson, (1991) cepas de *E. coli* produtoras de hemolisinas são em geral isoladas de pacientes com bacteremia, sepse e pielonefrite e provavelmente a atividade de virulência é multifatorial, incluindo além da captação de ferro dos eritrócitos, interferência na função fagocitária até toxicidade direta para o tecido do hospedeiro, incluindo as células renais.

Quando a prova da aerobactina, foi verificado que 43,1% (127/295) dos isolados produziram aerobactina. Entre os pacientes com ITU observou-se que no Grupo com ITU recorrente, 50,0% dos isolados produziram hemolisina, 39,6% no Grupo com ITU comunitária e 26,7% no grupo com ITU de internação hospitalar, comparados com 13,3% a 26,7% entre os isolados de pessoas sadias (Tabela 2).

A produção de aerobactina tem sido observada em isolados de *E. coli* de infecções graves, tanto do trato urinário como em 75,0% dos isolados responsáveis por urosepse, provavelmente por que promove o crescimento bacteriano em concentrações limitadas de ferro encontradas durante a infecção (Montgomerie *et al*, 1984; Johnson, 1991).

Sabe-se que a gravidade de uma doença é um reflexo da virulência da cepa infectante e a propensão do hospedeiro de responder a essa infecção. Em pacientes com bacteriúria assintomática, a mucosa vesical permanece inerte, mesmo a despeito da quantidade de bactérias no urina. Por outro lado, pacientes com pielonefrite aguda, tanto a resposta inflamatória local como a sistêmica são ativadas por fatores de virulência do microrganismo (Roche *et al*. 2005).

As cepas uropatogênicas possuem propriedades que contribuem para a colonização em estágios diferentes do processo infeccioso. Para a colonização e ascensão no trato urinário, a *E. coli* expressa fimbrias que especificamente reconhecem e se ligam a

receptores celulares a partir da região periuretral até o parênquima renal (Roche *et al.* 2005).

Em relação a pili1, foi verificado que 43,1% (127/295) isolados expressaram essa pili, numa variação de 20,0% a 46,4% entre os pacientes com ITU, comparados com 46,7% a 52,2% entre os isolados de pessoas sadias (Tabela 2).

A pili1 é encontrada na grande maioria das enterobactérias e a ela tem sido atribuídas funções, tais como: capacidade de promover a persistência (aderência) bacteriana, tanto em nível intestinal como vaginal e trato urinário, pela ligação a receptores glicoprotéicos com manose, bem como pela IgA secretória (Roche *et al.* 2005) e contribuição na invasão das células epiteliais da bexiga e replicação intracelular (Martinez *et al.* 2000). A pili 1 tem sido verificada em mais de 90% de isolados de *E. coli* tanto em comensais como em patogênicos, de acordo com Johnson (1991) e Yamamoto *et al.* (1995). Os resultados deste estudo mostraram que 46,4% a 52,2% dos isolados de *E. coli* intestinais expressavam essa pili.

Para a pili P, 18,0% (53/295) dos isolados de *E. coli* expressaram esta pili, sendo verificado que entre os pacientes com ITU, 46,7% dos isolados expressaram a pili P no Grupo com ITU de internação hospitalar, 29,2% nos isolados do Grupo com ITU comunitária e 28,6% no grupo com ITU recorrente (Tabela 2).

A pili P mostra uma forte associação com a doença aguda e gravidade de sintomas, sendo verificada em pelo menos 70,0% a 90,0% dos isolados de pielonefrite, em 36,0% dos isolados de cistite e em menos de 20% entre os isolados de bacteriúrias assintomáticas (Leffler & Svanborg-Edén, 1981), contrastando com 2,0% a 19,0% entre os isolados fecais (O'Hanley, 1990; Jonhson, 1991). Os resultados do presente trabalho evidenciaram uma taxa de 8,9% de expressão da pili P entre os isolados de pessoas sadias.

4.2 Distribuição dos fatores de virulência dos isolados de *E. coli* por paciente nos diversos grupos

Na Figura 7, observa-se as porcentagens de pacientes com isolados de *E. coli* separadamente por fator de virulência e por grupo de mulheres estudadas. Comparando os grupos (Figuras 7A, B e C), observa-se que quanto às provas de hemólise e vermelho congo, os valores encontrados foram muito semelhantes entre os grupos e materiais clínicos, ou seja, variaram de 20,0% a 28,6% (hemólise) e 100,0% (vermelho congo), diferentemente do verificado em relação às provas de aerobactina, pili 1, pili P e mobilidade quando comparadas entre os grupos.

A produção de aerobactina pelos isolados de *E. coli* do Grupo com ITU recorrente ocorreu em 92,8% (nível intestinal) e 57,1% (urina) dos casos, enquanto que, nos demais grupos foram observados valores inferiores. No Grupo colonização foi de 26,7% (intestinal) e 13,3 % (uretral/ periuretral), no Grupo com ITU comunitária de 20,0% e de 39,6 % para o Grupo com internação hospitalar.

Em relação à presença de pili 1, esta foi mais prevalente em isolados de *E. coli* de pacientes dos dois primeiros grupos, ou seja, Grupo de colonização e com ITU recorrente com taxas superiores a 50%, chegando a 71%, comparados com valores de cerca de 20% nos grupos com ITU comunitária e hospitalar. Por outro lado, para a pili P, verificou-se que esta foi mais prevalente em isolados de *E. coli* de pacientes hospitalizados com valor de 46,7%, comparados com os demais grupos que mostraram uma variação de 20,0% a 28,6%.

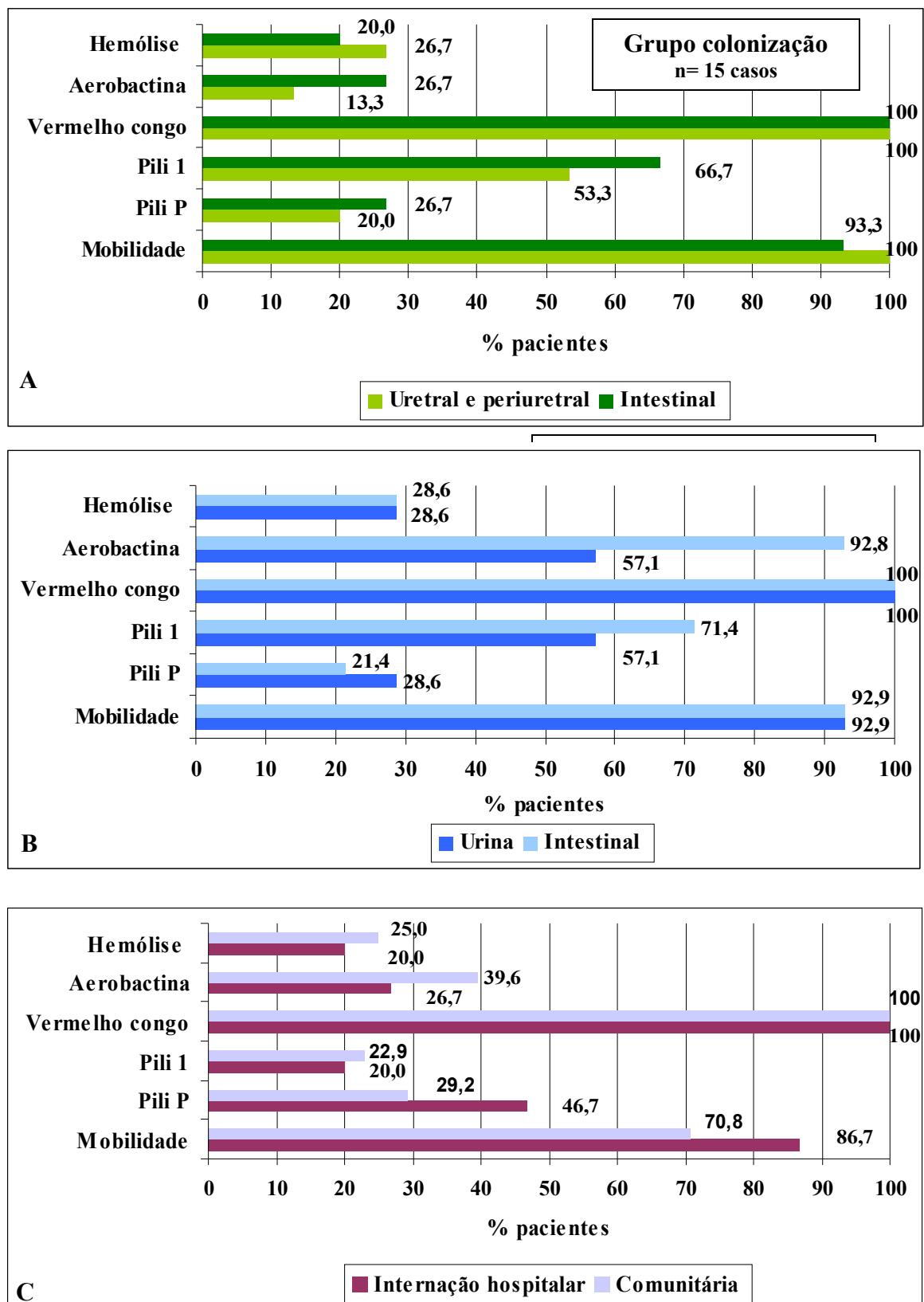


Figura 7: Porcentagem de pacientes com isolados de *E. coli* por prova fenotípica e grupo. A: Grupo de colonização; B: Grupo com ITU recorrente; C: Grupos com ITU comunitária e de internação hospitalar

4.3 Perfis fenotípicos dos isolados de *Escherichia coli*

A análise fenotípica dos 295 isolados de *E. coli* avaliados permitiu evidenciar 24 perfis distintos, os quais foram rotulados de A até X. Estes perfis se caracterizaram pela presença ou ausência de atividade hemolítica, produção de aerobactina, fixação de vermelho congo, presença de fimbrias (pili) do tipo 1 e P e de mobilidade (Tabela 3).

Do total dos 24 perfis fenotípicos, nove deles (P a X) apresentaram positividade da prova de hemólise num total de 54 isolados, dois quais 14 expressaram a pili P, ou seja, 25,9% (14/54) dos isolados hemolíticos. Doze deles apresentaram positiva a prova da aerobactina. Dos 127 isolados produtores de aerobactina, 21,3% (27/127) também expressaram a pili P e esta mesma porcentagem ocorreu para a associação de hemólise e aerobactina. Em relação da pili P 18,0% (53/295) isolados de *E. coli* expressaram a pili P, num total de 10 perfis, enquanto que 42,4% (125/295) expressaram a pili 1 em 9 perfis fenotípicos .

Vários trabalhos descrevem associações entre fatores de urovirulência, pelo fato de serem frequentemente codificados por elementos genéticos móveis denominados de ilhas de patogenicidade (PAI), como se verifica em Hacker & Kaper (2000). Estudos também tem verificado que as cepas uropatogênicas de *E. coli* podem abrigar várias ilhas de patogenicidade, as quais codificam adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro, mecanismos de secreção e produção de cápsula, e que a transferência horizontal destas ilhas possa ser uma importante ferramenta na evolução da virulência dessas cepas de *E. coli*, de acordo com Oelschlaeger *et al.* (2002).

Uma associação entre a atividade hemolítica das *E. coli* uropatogênicas com a presença de pili P tem sido com certa frequência observada, conforme O'Hanley *et al.* (1985), High *et al.* (1988) e Johnson (1991).

Tabela 3.: Relação dos perfis fenotípicos dos 295 isolados de *Escherichia coli*

Perfil fenotípico	Combinação de fatores de virulência ¹						Número de isolados de <i>Escherichia coli</i> (%)						
							Grupo colonização (n=120)		Grupo com ITU recorrente (n=112)		Grupo com ITU		Total (n= 295)
	He	Ae	VC	P1	PP	Mo	Uretral, peri-uretral (n=30)	Intestinal (n=90)	Urina (n=28)	Intestinal (n=84)	Comunitária (n=48)	Internação hospitalar (n=15)	
A	-	-	-	-	-	+	0	0	0	1 (1,2)	0	0	1 (0,3)
B	-	-	-	+	-	-	0	0	0	2 (2,4)	0	0	2 (0,7)
C	-	-	+	-	-	-	0	8 (8,9)	0	0	5 (10,4)	1 (6,7)	14 (4,7)
D	-	-	+	-	-	+	4 (13,3)	15 (16,6)	4 (14,3)	4 (4,8)	10 (20,8)	5 (33,2)	42 (14,2)
E	-	-	+	-	+	+	4 (13,3)	5 (5,6)	1 (3,6)	0	1 (2,0)	1 (6,7)	12 (4,1)
F	-	-	+	+	-	+	11 (36,7)	27 (30,0)	4 (14,3)	12 (14,3)	5 (10,4)	2 (13,3)	61 (20,7)
G	-	-	+	-	+	-	0	1 (1,1)	1 (3,6)	1 (1,2)	2 (4,2)	1 (6,7)	6 (2,0)
H	-	-	+	+	+	+	1 (3,3)	2 (2,2)	0	0	0	0	3 (1,0)
I	-	+	+	-	-	-	0	1 (1,1)	0	6 (7,1)	3 (6,2)	0	10 (3,4)
J	-	+	+	-	-	+	2 (6,7)	7 (7,8)	0	17 (20,2)	3 (6,2)	0	29 (9,8)
K	-	+	+	-	+	-	0	0	0	1 (1,2)	2 (4,2)	0	3 (1,0)
L	-	+	+	-	+	+	0	0	4 (14,3)	6 (7,1)	3 (6,2)	2 (13,3)	15 (5,1)
M	-	+	-	+	-	+	0	0	0	3 (3,6)	0	0	3 (1,0)
N	-	+	+	+	-	-	0	0	2 (7,1)	3 (3,6)	0	0	5 (1,7)
O	-	+	+	+	-	+	0	10 (11,1)	5 (17,8)	18 (21,4)	2 (4,2)	0	35 (11,9)
P	+	-	+	-	+	-	0	0	0	1 (1,2)	0	0	1 (0,3)
Q	+	-	+	-	-	+	4 (13,3)	0	2 (7,1)	0	2 (4,2)	0	8 (2,7)
R	+	-	+	-	+	+	0	0	1 (3,6)	0	2 (4,2)	1 (6,7)	4 (1,4)
S	+	-	+	+	-	+	2 (6,7)	8 (8,9)	1 (3,6)	1 (1,2)	2 (4,2)	0	14 (4,7)
T	+	+	+	-	-	+	2 (6,7)	6 (6,7)	2 (7,1)	6 (7,1)	0	0	16 (5,4)
U	+	+	+	-	+	-	0	0	0	0	2 (4,2)	0	2 (0,7)
V	+	+	+	-	+	+	0	0	0	2 (2,4)	2 (4,2)	1 (6,7)	5 (1,7)
W	+	+	+	+	-	+	0	0	0	0	2 (4,2)	0	2 (0,7)
X	+	+	+	+	+	+	0	0	1 (3,6)	0	0	1 (6,7)	2 (0,7)

¹ Perfil fenotípico de acordo com as provas de hemólise (He); aerobactina (Ae); vermelho congo (VC); pili 1 (P1); pili P (PP) e mobilidade (Mo).

Com exceção de três perfis fenotípicos (A, B e C), os demais apresentaram combinações de pelo menos duas das características estudadas, fato que poderia sugerir a existência de ilhas de patogenicidade (PAI).

4.3.1 Grupo colonização

A Tabela 4 mostra a distribuição dos perfis fenotípicos dos isolados de *E. coli* da uretral/periuretral e intestinal do grupo colonização, bem como o número de isolados observados para cada tipo. Observa-se que ocorreu concordância do perfil fenotípico entre os sítios de colonização uretral/periuretral e da microbiota intestinal em 10 casos (1, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13 e 14). Em oito casos foram verificados mais de um perfil fenotípico para os isolados de *E. coli* de origem intestinal.

Tabela 4: Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* do Grupo de colonização de acordo com o perfil fenotípico

Grupo colonização	Perfil fenotípico ¹ (n)	
	Uretral e periuretral (n= 30)	Intestinal (n=90)
* C-1	E (2)	E (3); D (3)
C-2	F (2)	O (6)
* C-3	T (2)	T (6)
* C-4	F (2)	F (4); D (1); G (1)
C-5	E (2)	F (6)
* C-6	F (2)	F (6)
* C-7	F (2)	F (3); E (2); D (1)
C-8	Q (2)	F (3); D (2); S (1)
* C-9	F (2)	F (3); D (1); H (2)
C-10	D (1); H (1)	O (4); J (2)
* C-11	D (2)	D (2); C (2); F (2)
* C-12	J (2)	J (5); I (1)
* C-13	D (1); F (1)	D (6)
* C-14	S (2)	S (6)
C-15	Q (2)	C (6)

¹ Perfil fenotípico considerando as provas de hemólise, aerobactina, vermelho congo, pili 1, pili P e mobilidade; n: número de isolados de *E. coli*; C: colonização; * casos com o mesmo perfil fenotípico na uretra/periuretral e intestinal.

O perfil fenotípico mais freqüente tanto em nível de uretral/periuretral quanto em nível intestinal, foi o F que tem a combinação de três fatores de virulência: ligação ao vermelho congo, presença de pili 1 e mobilidade positiva (Tabelas 4 e 3).

4.3.2 Grupo com ITU recorrente

A Tabela 5 mostra os perfis fenotípicos dos isolados de *E. coli*, obtidos a partir da urina e da microbiota intestinal, bem como o número de isolados observados para cada tipo. Verifica-se que ocorreu concordância do perfil fenotípico entre os isolados obtidos dos dois materiais clínicos para oito pacientes (casos 2, 3, 4, 5, 9, 10, 13 e 14), e discordância em seis casos. Observa-se uma grande variedade de perfis, num total de 18 tipos, o que pode ser devido ao uso freqüente e variado de antimicrobianos no tratamento e profilaxia destas ITU (Nickel, 2005).

Em relação à freqüência dos perfis fenotípicos verificados neste grupo, observa-se na Tabela 3 que o mais prevalente foi o tipo O, com quatro fatores de virulência (produtor de aerobactina, vermelho congo positivo, presença de pili 1 e móvel), tanto em nível intestinal quanto na urina, sendo seguido pelo perfil J (três fatores virulência: aerobactina, vermelho congo e mobilidade positivos) somente para os isolados da microbiota intestinal.

Tabela 5: Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* do Grupo com ITU recorrente de acordo com perfil fenotípico

Grupo com ITU recorrente R - caso	Perfil fenotípico ¹ (n)	
	Urina (n=28)	Intestinal (n=84)
R-1	L (2)	J (6)
* R-2	O (2)	O (6)
* R-3	F (2)	F (6)
* R-4	S (1); T (1)	S (1) , J (4); F (1);
* R-5	O (2)	O (1); F (1); G (1); L (1); P (1); V (1)
R-6	R (1); X (1)	D (2); B (1); F (2); M (1)
R-7	E (1); G (1)	J (1); O (3); M (2)
R-8	Q (2)	O (4); J (2)
* R-9	L (2)	L (5); V (1)
* R-10	F (2)	F (1); D (2); A (1); B (1); K (1)
R-11	D (2)	J (4); F (1); O (1)
R-12	D (2)	I (6)
* R-13	N (2)	N (3); O (3)
* R-14	T (1); O (1)	T (6)

¹ Perfil fenotípico considerando as provas de hemólise, aerobactina, vermelho congo, pili 1, pili P e mobilidade; n: número de isolados de *E. coli*; R: recorrente; * casos com o mesmo perfil fenotípico na urina e em nível intestinal.

4.3.3 Grupos com ITU comunitária e de internação hospitalar

Na Tabela 3, observa-se o percentual dos perfis fenotípicos dos isolados de *E. coli* de ITU de origem comunitária e de internação hospitalar. O perfil mais encontrado nos dois grupos foi o D. Para os isolados de *E. coli* de ITU de pacientes internados, esse perfil que ocorreu em 33,2 % das amostras, apresenta a combinação de dois fatores de virulência (vermelho congo e mobilidade positivos). Isso evidencia, embora o tamanho amostral seja um pouco restrito, a “pouca necessidade” de fatores de urovirulência para o estabelecimento da infecção, uma vez que, trata-se de uma população vulnerável, seja pela presença de doenças de base ou pelo uso de cateteres vesicais que ocorre em cerca de 15 % a 25 % dos pacientes hospitalizados (Maki & Tambyah, 2001).

4.4 Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos

4.4.1 Grupos colonização e com ITU recorrente

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli* do Grupo colonização foi semelhante para aqueles de origem uretral/periuretral em relação aos intestinais, para ampicilina e trimetoprim/sulfametozaxol (18,7%) e ácido nalidíxico, ampicilina/sulbactam, gentamicina e norfloxacin (0%). Não houve concordância nas taxas de resistência de cefalotina que foram de 6,2 % e 25,0%, respectivamente, para uretral/periuretral e intestinal (Tabela 6).

Para o Grupo de ITU recorrente, evidenciou-se um aumento nas taxas de resistência para a maioria das drogas testadas, com exceção do trimetoprim/sulfametoxazol, em

comparação com o Grupo de colonização, tanto para os isolados de *E. coli* da urina, quanto para os de origem intestinais (Tabela 6).

Essas altas taxas de resistência aos antimicrobianos verificadas no Grupo de ITU recorrente, podem estar refletindo o uso freqüente de drogas antimicrobianas para tratamento e profilaxia de ITU recorrente (Nickel, 2005) exercendo uma pressão seletiva de mutantes resistentes. Com exemplo do acima exposto, Gupta *et al.* (2005) verificaram a emergência de *E. coli* de origem fecal, resistentes a uma quinolona, ao longo do tratamento de cistites não-complicadas em mulheres.

Tabela 6: Porcentagem de resistência a oito antimicrobianos entre os isolados de *Escherichia coli* dos Grupos colonização e com ITU recorrente

Agente antimicrobiano	Grupo colonização		Grupo com ITU recorrente	
	Uretral e periuretral	Intestinal	Urina	Intestinal
	(n = 16)	(n = 16)	(n = 17)	(n = 17)
	R %	R %	R %	R %
Ácido nalidíxico	0	0	6,0	0
Ampicilina	18,7	18,7	53,0	41,0
Ampicilina/sulbactam	0	0	6,0	18,0
Cefalotina	6,2	25,0	70,6	76,5
Gentamicina	0	0	23,5	18,0
Nitrofurantoína	6,2	6,2	18,0	24,0
Norfloxacina	0	0	6,0	0
Trimetoprim/sulfametoxazol	18,7	18,7	12,0	12

n: número de isolados de *E. coli*; R: resistente

4.4.2 Grupos com ITU comunitária e de internação hospitalar

Os resultados quanto à porcentagem de resistência aos oito antimicrobianos, como se observa na Tabela 7, mostram taxas duas a quatro vezes maiores de resistência para os isolados de *E. coli* obtidos de pacientes com internação hospitalar, comparados com aqueles com ITU comunitária.

Comparando os perfis de suscetibilidade de *E. coli* isoladas de ITU em hospitais da América Latina com os resultados do projeto SENTRY de vigilância, verificou-se que os níveis de resistência foram em geral muito inferiores aos valores encontrados no presente trabalho. As taxas de resistência do SENTRY relativos aos isolados de *E. coli* de ITU em comparação com as analisadas no presente estudo foram, respectivamente: ampicilina (57,3%/86,7%), ampicilina/sulbactam (16,3% / 46,7%), gentamicina (6,5% / 40,0%), nitrofurantoína (9,8% /13,3%) e trimetoprim/sulfametoxazol (56,9% / 60,0%) (Sader *et al.* 1999).

Sahm *et al.* (2001), em estudo realizado nos Estados Unidos com isolados de *E. coli* de ITU de origem hospitalar, observaram taxas de resistência menores do que as obtidas no presente estudo, sendo de 40,4% (ampicilina), 17,5 % (cefalotina), 1,0 % (nitrofurantoína) e 17,5 % (sulfametoxazol/trimetoprim). O mesmo estudo para os isolados de *E. coli* de ITU comunitária também evidenciou taxas de resistência menores que as obtidas no presente trabalho, sendo de 38,4% (ampicilina), 14,0% (cefalotina) e 0,7% (nitrofurantoína).

Tabela 7: Porcentagem de resistência a oito antimicrobianos entre os isolados de *Escherichia coli* dos Grupos com ITU comunitária e internação hospitalar

Agente antimicrobiano	Grupos com ITU	
	Comunitária (n = 48)	Internação hospitalar (n = 15)
	R %	R %
Ácido nalidíxico	15,2	53,3
Ampicilina	47,8	87,7
Ampicilina/sulbactam	13,0	46,7
Cefalotina	59,0	100,0
Gentamicina	17,4	40,0
Nitrofurantoína	6,5	13,3
Norfloxacina	6,5	40,0
Trimetoprim/sulfametoxazol	17,4	60,0

n: número de isolados de *E. coli*; R: resistente

De acordo com Richard *et al.* (2001) dois fatores de risco foram associados com a emergência de bacilos Gram-negativos entéricos resistentes a fluorquinolonas em pacientes hospitalizados: o uso prévio destas drogas e a duração prolongada da hospitalização.

De uma maneira geral, tem-se verificado que isolados patogênicos de *E. coli* vem apresentando um grande potencial para desenvolver resistência. Dados recentes mostram o aumento de resistência das *E. coli* em alguns países, a disseminação de beta lactamases de espectro ampliado que degradam também cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos, e cada vez mais relatos de multiresistência (Oteo *et al.* 2005).

Tem sido descrito mundialmente tanto na comunidade quanto nos hospitais que o uso excessivo de antimicrobianos vem provocando a ocorrência de resistência bacteriana (Bantar *et al.* 2003), o que pode explicar esses resultados verificados nos três grupos de mulheres com ITU analisadas no presente estudo.

4.5 Análise dos perfis fenotípico, suscetibilidade aos antimicrobianos e genotípico dos isolados de *Escherichia coli*

Os isolados de *E. coli* foram testados frente a oito antimicrobianos, resultando em 40 perfis de suscetibilidade ou antibiogramas (Tabela 8). Foram selecionados os isolados por paciente e por material que apresentaram semelhança dos perfis fenotípicos para as análises de suscetibilidade aos antimicrobianos e genotípica pelo método de eletroforese de campo pulsado (PFGE).

Tabela 8: Perfis de suscetibilidade a oito antimicrobianos dos isolados de *E. coli*

Antibiótipo	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos							
	NA	AMP	SAM	KF	CN	F	NOR	STX
1	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	S	R
3	S	R	S	S	S	S	S	S
4	S	R	S	S	S	S	S	R
5	S	R	S	S	S	S	R	S
6	S	R	S	S	S	R	S	S
7	S	R	S	R	S	S	S	S
8	S	R	S	R	S	S	S	R
9	S	R	S	R	S	R	S	S
10	S	R	S	R	R	S	S	S
11	S	R	R	R	S	R	S	S
12	S	R	R	R	S	R	S	R
13	S	R	R	R	S	S	R	R
14	S	R	R	R	S	S	S	R
15	S	R	R	R	R	S	S	R
16	S	S	S	R	S	S	S	S
17	S	S	S	R	S	S	S	R
18	S	S	S	R	R	S	S	S
19	S	S	S	R	S	R	S	S
20	S	S	S	R	R	S	S	R

S: sensível; R: resistente; NA: ác.nalidíxico; AMP: ampicilina; SAM: ampicilina-sulbactam; KF: cefalotina; CN: gentamicina; F: nitrofurantóina; NOR: norfloxacina; STX: sulfametoxazol-trimetoprim

Tabela 8 (cont.): Perfis de suscetibilidade a oito antimicrobianos dos isolados de *E. coli*

Antibiotipo	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos							
	NA	AMP	SAM	KF	CN	F	NOR	STX
21	S	S	S	R	S	S	R	R
22	S	S	S	R	R	R	S	S
23	S	S	S	S	R	S	S	S
24	S	S	S	S	R	R	S	R
25	S	S	S	S	R	S	S	R
26	S	S	S	S	S	R	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S	R
28	R	S	S	S	S	S	S	R
29	R	R	S	R	S	S	S	S
30	R	R	S	R	S	S	S	S
31	R	R	S	S	S	R	S	S
32	R	R	S	R	R	S	S	R
33	R	R	S	R	S	S	R	S
34	R	R	R	R	S	S	S	S
35	R	R	R	R	S	S	R	S
36	R	R	R	R	S	S	R	R
37	R	R	R	R	S	R	R	S
38	R	R	R	R	R	S	R	S
39	R	R	R	R	R	S	R	R
40	R	R	R	R	R	R	R	R

S: sensível; R: resistente; NA: ác.nalidíxico; AMP: ampicilina; SAM: anpicilina-sulbactam; KF: cefalotina; CN: gentamicina; F: nitrofurantóina; NOR: norfloxacina; STX: sulfametoxazol-trimetoprim

4.5.1 Grupo colonização

Na Tabela 9, observa-se os resultados obtidos dos isolados de *E. coli* de origem uretral/periuiretral e intestinal de 15 mulheres do Grupo de colonização, sem histórico recente de ITU ou uso recente de antimicrobianos, quanto aos perfis fenotípico, de suscetibilidade aos antimicrobianos e o suas respectivas genotipagens.

A análise dos resultados mostrou que através do PFGE foi possível determinar um percentual de 40,0% (6/15) na identidade clonal do isolados de *E. coli* provenientes dos dois sítios anatômicos (casos C-1, C-3, C-4, C-6, C-13 e C-14).

Foi verificado também que para estes seis casos, a análise do perfil fenotípico (fatores de virulência) em associação com o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos mostrou ser adequada, no presente trabalho, para reconhecer cepas de um mesmo clone.

Tabela 9: Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* do Grupo colonização de acordo com o perfil fenotípico, suscetibilidade aos antimicrobianos e PFGE

Grupo colonização	Perfil fenotípico ¹ / Perfil de suscetibilidade ²		Perfil genotípico (PFGE) ³	
	Uretral e periuretral	Intestinal	Clonal (=)	Não clonal (≠)
* C-1	E / 1	E / 1	E = E	
C-2	F / 1	O / 1		F ≠ O
* C-3	T / 1	T / 1	T = T	
* C-4	F / 1	F / 1	F = F	
C-5	E / 1	F / 4		E ≠ F
* C-6	F / 16	F / 16	F = F	
C-7	F / 1	F / 16		F ≠ F
C-8	Q / 1	D / 1; S / 1	D = S	Q ≠ D; Q ≠ S
C-9	F / 4	F / 1		F ≠ F
C-10	D / 4; H / 1	O / 1		D ≠ O ≠ H
C-11	D / 26	D / 9		D ≠ D
C-12	J / 1	J / 16		J ≠ J
* C-13	D / 4	D / 4	D = D	
* C-14	S / 1	S / 1	S = S	
C-15	Q / 1	C / 16		Q ≠ C

¹ Perfil fenotípico de acordo com as provas de hemólise, aerobactina, vermelho congo, pili 1, pili P e mobilidade (Tabela 3, p. 38); ² Antibiotipos conforme o perfil de suscetibilidade a oito antimicrobianos (Tabela 8, p. 48 e 49); ³ Técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE); * casos com perfil genotípico idêntico para isolados de *E. coli* em nível uretral/periuretral e intestinal.

Na Figura 8 observa-se os diversos padrões de PFGE encontrados nos isolados de *E. coli* de três casos deste grupo. Nesta Figura é possível observar que padrões de PFGE distintos nas colunas 1 e 2 (caso C-7), colunas 3 e 4 (caso C-9), colunas 5 e 6 (caso C-10) e idênticos nas colunas 7 e 8 (caso C-10).

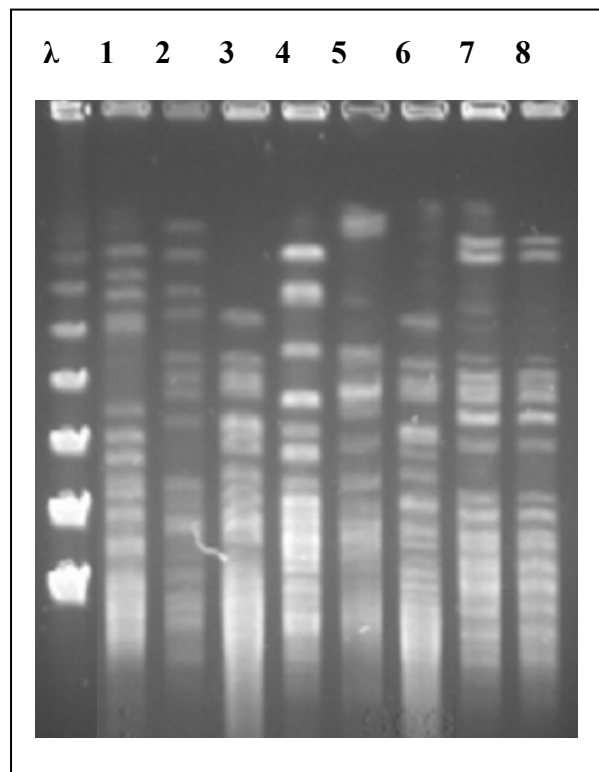


Figura 8: Padrões de PFGE dos isolados de *E. coli* de três casos do Grupo colonização: **coluna** – nº caso (origem do isolado): **1** – 7 (uretral/periuretral); **2** – 7 (intestinal); **3** – 9 (uretral/periuretral); **4** – 9 (intestinal); **5** -10 (uretral/periuretral); **6** -10 (uretral/periuretral); **7**-10 (intestinal) e **8** -10 (intestinal) λ: marcador de peso molecular *lambda ladder* 48,5 Kb

Existem duas teorias a respeito da origem intestinal da *E. coli* responsável pela alta frequência nas infecções urinárias. A primeira, seria devido à prevalência da *E. coli* nas fezes; e a segunda seria em virtude da presença de fatores de urovirulência dessas

bactérias que teriam uma maior capacidade adaptativa ao trato urinário. Uma teoria não exclui a outra, entretanto ambas estão considerando a estabilidade da cepa dominante em nível intestinal ao longo do tempo, contudo trabalhos como os de Schlager *et al.* (2002), ao examinarem a diversidade clonal de *E. coli* de origem intestinal de uma população sadia que não estava fazendo uso de antimicrobianos e sem atividade sexual, encontraram freqüentes flutuações na composição da microbiota intestinal ao longo de três a quatro semanas de estudo.

4.5.2 Grupo com ITU recorrente

Na Tabela 10, observa-se os resultados dos 14 pacientes do Grupo com ITU recorrente, de acordo com os perfis fenotípico, de suscetibilidade aos antimicrobianos e ao genotípico.

O encontro da mesma cepa bacteriana nos tratos intestinal e urinário simultaneamente, foi observado em 5 (35,7%) dos 14 casos estudados.

Nestes cinco casos (R-4, R-5, R-9, R-13 e R-14) se verificou a concordância também quanto aos parâmetros de fatores de virulência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Entretanto, se fossem considerados a análise dos perfis (fenotípico e suscetibilidade aos antimicrobianos) em associação, a concordância bacteriana seria de 42,9% (6/14).

Analisando isolados de *E. coli* de urina dos casos R-4, R-6 e R-7, foi possível identificar em cada um deles, dois perfis fenotípicos distintos com diferenças para os fatores de virulência relacionados à produção de aerobactina, pili 1 e mobilidade, mas que pela análise do perfil molecular se mostraram, em cada caso, idênticos (Figura 9, colunas 9 e 10), assim como para os antibiótipos. Já para o caso R-14, foram isoladas da urina e,

portanto, de uma paciente com ITU, duas cepas de *E. coli* (Figura 9, colunas 12 e 13) com distintos perfis fenotípicos.

Tabela 10: Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* do Grupo com histórico de ITU recorrente de acordo com o perfil fenotípico, suscetibilidade e genotípico

Grupo com ITU recorrente	Perfil fenotípico ¹ / Perfil de suscetibilidade ²		Perfil genotípico (PFGE) ³	
	Urina	Intestinal	Clonal (=)	Não clonal (≠)
R-1	L / 40	J / 16		L ≠ J
R-2	O / 10	O / 22		O ≠ O
R-3	F / 9	F / 9		F ≠ F
* R-4	S / 1; T / 1	S / 1	S = S; S = T	
* R-5	O / 16	O / 16	O = O	
R-7	G / 7; E / 7	J / 16	G = E	G, E ≠ J
R-8	Q / 25	J / 8		Q ≠ J
* R-9	L / 10	L / 10	L = L	
R-10	F / 1	F / 9		F ≠ F
R-11	D / 26	J / 14; F / 1		D ≠ J, F
R-12	D / 9	I / 26		D ≠ I
* R-13	N / 16	N / 16	N = N	
* R-14	T / 1; O / 1	T / 1	T = T	T ≠ O

¹ Perfil fenotípico de acordo com as provas de hemólise, aerobactina, vermelho congo, pili 1, pili P e mobilidade (ver Tabela 3, p. 38); ² Antibiotipos conforme o perfil de suscetibilidade a oito antimicrobianos (ver Tabela 8, p.48 e 49); ³ Técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE). R: recorrente; * casos com perfil genotípico idêntico para isolados de *E. coli* da urina e intestinal.

Na Figura 9 observa-se os diversos padrões de PFGE encontrados nos isolados de *E. coli* de seis casos do Grupo com ITU recorrente. Nesta Figura foi possível observar padrões idênticos nas colunas 7 e 8 (caso R-5), 9 e 10 (caso R-7), 13 e 14 (caso R-14) e distintos para os demais casos.

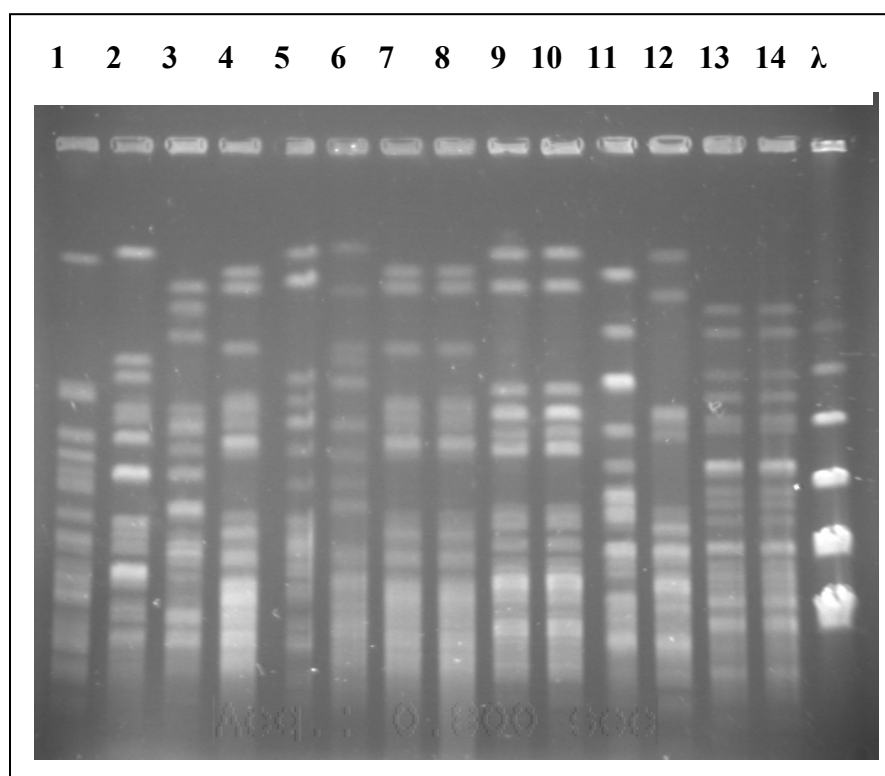


Figura 9: Padrões de PFGE dos isolados de *E. coli* de seis casos do Grupo com ITU recorrente: **coluna** – nº caso (origem do isolado): **1** – 1 (urina); **2** – 1 (intestinal); **3** – 2 (urina); **4** – 2 (intestinal); **5** – 3 (urina); **6** – 3 (intestinal); **7** – 5 (urina); **8** – 5 (intestinal); **9** – 7 (urina); **10** – 7 (urina); **11** – 7 (intestinal); **12** – 14 (urina); **13** – 14 (urina) e **14** – 14 (intestinal). λ: marcador de peso molecular *lambda ladder* 48,5 Kb

Observações de alguns trabalhos, tais como de Foxman *et al.* (1995), Jantunen *et al.* (2002) e Ejrnaes *et al.* (2006) constataram que a bactéria, associada à ITU recorrente, era em muitos casos fenotípica ou genotípica idêntica à cepa bacteriana que causou a infecção inicial. Baseado nestes achados tem sido investigado como uma das explicações da natureza recorrente da infecção, o ressurgimento da cepa uropatogênica a partir de reservatórios quiescentes, estabelecidos no interior da mucosa vesical, após uma infecção aguda (Mulvey *et al.* 2001; Anderson *et al.* 2004; Justice *et al.* 2004).

5. CONCLUSÕES

1. A expressão dos fatores de virulência dos isolados de *Escherichia coli* de infecções do trato urinário (ITU) feminino foi extremamente variada, sendo verificado que a grande maioria dos perfis fenotípicos apresentou combinações de pelo menos dois dos fatores de virulência estudados.
2. Isolados de *E. coli* da microbiota intestinal apresentaram uma variabilidade de perfis fenotípicos, o que pode ser um reflexo da relação promíscua destas bactérias no ambiente intestinal.
3. No Grupo de mulheres com ITU recorrente a diversidade de perfis fenotípicos foi maior, podendo ser um reflexo do uso rotineiro de antimicrobianos nestas infecções.
4. Isolados de *E. coli* do Grupo de mulheres com ITU recorrente mostraram-se mais resistentes aos antimicrobianos do que aqueles do grupo de mulheres saudáveis (Grupo colonização), provavelmente devido à pressão seletiva pelo amplo uso de antimicrobianos para o tratamento e a profilaxia das infecções urinárias.

5. Isolados de *E. coli* do Grupo de mulheres com ITU de internação hospitalar mostraram-se mais resistentes aos antimicrobianos do que os do Grupo de ITU comunitária, os quais apresentaram taxas maiores comparados com o Grupo Colonização. Esses resultados evidenciam grande problema em nível hospitalar, e que também vem sendo observado na comunidade.

6. A análise dos perfis fenotípicos (fatores de virulência) em associação com os de suscetibilidade aos antimicrobianos se mostrou um método adequado para a identificação da mesma cepa de *E. coli*, com taxa de concordância semelhante a obtida pela genotipagem para o Grupo Colonização (40,0%) e de 42,9% para o Grupo com ITU recorrente.

7. A tipagem molecular indicou que foi possível encontrar o mesmo clone bacteriano de *E. coli* isolado a uretral/periuretral e fezes em 40,0% (6/15) dos casos do Grupo colonização e em 35,7% (5/14) dos pacientes do Grupo com ITU recorrente, na urina e fezes, confirmando a importância da colonização fecal como fonte de contaminação das vias urinárias.

- Bower, J.M.; Eto, D.S.; Mulvey, M.A. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. **Traffic**. 6: 18-31.
- Buchanan, K.; Falkow, S.; Hull, R.A.; Hull, S.I. (1985). Frequency among *Enterobacteriaceae* of the DNA sequences encoding type 1 pili. **J. Bacteriol.** 162(2): 799-803
- Carbonetti, N.H.; Boonchai, S.; Parry, S.H. (1986). Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. **Infect. Immun.** 51:966-968.
- CLSI.(2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Informational supplement. M100-S15. Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa.
- Duguid, J.P.; Smith, I.W.; Dempster, G. (1955). Non-flagellar filamentous appendages ('fimbriae') and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. **J. Pathol. and Bacteriol.** 70:335-348.
- Ejrnaes, K.; Sandvang, D.; lundgren, B.; Ferry, S.; Holm, S.; Monsen, T.; Lundholm, R.; Frimodt-Moller, N. (2006). Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. **J. Clin. Microbiol.** 44(5): 1776-1781.
- Elliott, S.J.; Srinivas, S.; Albert, M.J.; Alam, K.; Robins-Browne, R.M.; Gunzburg, S.T.; Mee, B.J.; Chang, B.J. (1998). Characterization of the roles of hemolysis and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. **Infec. Imm.**66(5):2040-2051.
- Emödy, L.; Kerényi, M.; Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **Intern. J. Antimicrobial Agents.** 22: S29-33.

- Giamarellou, H. (2001). Uncomplicated urinary tract infectious. **Nephrol. Dial. Transplant.**16:129-131.
- Gupta, K.; Hooton, T.M.; Stamm, W.E. (2001). Increase antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. **Ann. Intern. Med.** 135: 41-50.
- Gupta, K.; Hooton, T.M.; Stamm, W.E. (2005). Isolation of fluorquinolone-resistant rectal *Escherichia coli* after treatment of acute uncomplicated cystitis. **J. Antimicrob. Chemother.** 56: 243-246.
- Gupta, K.; Stapleton, A.E.; Hooton, T.M.; Roberts, P.L.; Fennel, C.L.; Stamm, W.E. (1998). Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. **J. Infect. Dis.** 178:446-450.
- Hacker, J.; Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Ann. Rev. Microbiol.** 54: 641-679.
- Hanna, A.; Berg, M.; Stout, V.; Razatos, A. (2003). Role of capsular colonic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 69(8): 4474-4481.
- High, N.J.; Hales, B.A.; Jann, K.; Boulnois, G.J. (1988). A back of urovirulence genes encoding multiple fimbriae and hemolysin in *Escherichia coli* o4:K12:H⁻. **Infect. Immun.** 56: 513-517.
- Jantunen, M.E.; Saxén, H.; Salo, E.; Siitonen, A. (2002). Recurrent urinary tract infections in infancy: relapses or reinfections ? . **DIS**, 185: 375-379.
- Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.** 4(1):80-128.

- Johnson, J.I.; Chilton, W.S. (1966). Galactosamine glycan of *Chondrococcus columnaris*. **Science**. 152:1247-1248.
- Jones, R.N.; Pfaller, M. A. (1998). Bacterial resistance: a world-wide problem. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 31:379-388.
- Justice, S. S.; Hung, C.; Theriot, J.A.; Fletcher, D.A.; Anderson, G.G.; Footer, M.J.; Hultgren, S.J. (2004). Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. **PNAS**. 101(5): 1333-1338.
- Kallenius, G.; Svenson, S.B.; Mollby, R.; Cedergren, B.; Hultberg, H.; Winberg, J. (1981). Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *Escherichia coli*. **Lancet**. 2: 604-606.
- Karlowsky, J.A.; Thornsberry, C.; Jones, M.E.; Sahm, D.F. (2003). Susceptibility of antimicrobial-resistant urinary *Escherichia coli* isolates to fluorquinolones and nitrofurantoin. **Clin. Infect. Dis.** 36(15): 183-187.
- Kau, A.L.; Hunstad, D.A.; Hultgren, S.J. (2005). Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. **Curr. Opin. Microbiol.** 8:54-59.
- Keane, W.F.; Welch, R.; Gekker, G.; Petersen, P.K. (1987). Mechanism of *Escherichia coli* α -hemolysin induced injury to isolated renal tubular cells. **Am. J. Pathol.** 126: 350-357.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C.Jr. (2001). **Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, Capítulo 15. **Provas de sensibilidade a agentes antimicrobianos**. p 794-866

- Korhonen, T.K.; Vaisaxén, V.; Saxéo, H.; Hultberg, H.; Svenson, S.B. (1982). P-antigen recognizing fimbriae from human uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.** 37: 286-291.
- Kunin, C.M. (1996). **Urinary Tract Infectious and Pielonephritis.** In: Bennett, J.C. and Plum, F. (Ed.) **Cecil Textbook of Medicine.** 20 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp 602-605.
- Kucheria, R.; Dasgupta, P.; Sacks, S.H.; Khan, M.S.; Sheerin, N.S. (2005). Urinary tract infections: new insights into a common problem. **Postgrad. Med. J.** 81:83-86.
- Lane, M.C.; Lockett, V.; Monterosso, G.; Lamphier, D.; Weinert, J.; Heber, J. R.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. (2005). Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. **Infect. Immun.** 73(11): 7644-7656.
- Langermann, S.; Palaszynski, S.; Barnhart, M.; Auguste, G.; Pinkner, J.S.; Burlein, J.; Barren, P.; Koenig, S.; Leath, S.; Jones, C.H.; Hultgren, S.J. (1997). Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. **Science.** 276:607-11.
- Leffler, H.; Svanborg-Edén, C. (1981). Glycolipid receptors from uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. **Infect. Immun.** 34:920-929.
- Lewi, D.S.; Correa, L.; Wey, S.B. (2004). **Infecções do Trato Urinário.** In: Salomão, R.; Pignatari, A.C.C. (Ed.) **Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar de Infectologia/ UNIFESP/ Escola Paulista de Medicina.** São Paulo: Manole. pp 85-95.
- Lidin- Janson, G.; Lincoln, K.B.; Olling, S.; Wedil, H. (1978). The homogeneity of the faecal coliform flora of normal school-girls, characterized by serological and biochemical properties. **Med. Microbiol. Immunol. (berl).** 164(4): 247-253.

- Linggood, M.A.; Ingram, P.L. (1982). The role of alpha haemolysin in the virulence of *Escherichia coli* for mice. **J. Med. Microbiol.** 15: 23-30.
- Martinez, J.; Mulvey, M.A.; Schilling, J.D.; Pinkner, J.S.; Hulgren, S.J. (2000). Type 1 pilis-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J.** 19(12): 2803-2812.
- Maurelli, A.T.; Blackmon, B.; Curtiss, R. (1984). Loss of pigmentation in *Shigella flexneri* 2a Is correlated with loss of virulence and virulence-associated plasmid. **Infect. Immun.** 43(1): 397-401.
- McLaughlin, S.P.; Carson, C.C. (2004). Urinary tract infections in women. **Med. Clin. N. Am.** 88: 417-429.
- Montgomerie, J.Z.; Bindereif, A.; Neilands, J.B. (1984). Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteraemia . **Infect.Immun.** 46: 835-838.
- Maki, D.G.; Tambyah, P.A. (2001). Engineering out the risk of infection with urinary catheters. **Emerg. Infect. Dis.** 7(2): 342-347.
- Mulvey, M.A.; Schilling, J.D.; Hultgren, S.J. (2001). Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. **Infect. Immunit.** 69(7): 4572-4579.
- Naber, K.G. (2000). Survey on antibiotic usage in the treatment of urinary tract infection. **J. Antimicrob. Chemother.** 46(Suppl.1): 49-52.
- Neilands, J.B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **J. Biol. Chem.** 270(45): 26723-26726.

- Nickel, J.C. (2005). Practical management of recurrent urinary tract infections in premenopausal women. **Rev. Urol.** 7(1): 11-17.
- Nicolle, L.E. (2001). Epidemiology of urinary tract infection. **Infect. Med.**18: 153-162.
- Oelschlaeger, T.A.; Dobrindt, U.; Hacker, J. (2002). Virulence factors of uropathogens. **Current Opinion in Urology.** 12:22-38.
- O'Hanley, P.; Lark, D. ; Falkow, S.; Schoolnik, G. (1985). Molecular basis of *Escherichia coli* colonization of the upper urinary tract in BALB/c mice. **J. Clin. Invest.** 75 : 347-360.
- O'Hanley, P. (1990). Pyelonephritis: pathogenesis and management update. Developing *Escherichia coli* vaccines to prevent pyelonephritis. **Dialogue. Pediatr. Urol.** 9:7-8.
- Oteo, J. ; Lázaro, E. ; Abajo, F.J. ; Baquero, F. ; Campos, J. Spanish members of EARSS. (2005). Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. **Emerg. Infect. Dis.** 11(4) : 546- 553.
- Petrelli, D.; Zampaloni, C.; D'Ércole, S.; Prenna, M. ; Ballarini, P. ; Ripa, S. ; Vitali, L.A. (2006). Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 25(12): 773-781.
- Pfaller, M.A. (2001). Molecular approaches to the diagnosis and management of infectious diseases. Practical and cost implications. **Emerg. Infect. Dis.** 7: 312-318.
- Pfaller, M.A.; Herwaldt, L.A. (1997). The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. **Clin. Infect. Dis.**25:858-870.

- Sader, H.S.; Pfaller, M.A.; Hollis, R.J. (1995). The use of molecular techniques in the epidemiology and control of hospital infectious. **Clin. Lab. Med.** 15:407-431.
- Sader, H. S.; Jones, R.N.; Pfaller, M.A.; Doern, G.V.; Reis, A.O.; Sampaio, J.; Zoccoli, C; SENTRY Study Group – América Latina (1999). Antimicrobial susceptibility of bacteria causing urinary tract infections in Latin American hospitals: Results from SENTRY antimicrobial surveillance program. **Clin. Microbiol. Infect.** 73(4): 1-12.
- Sáenz, Y.; Briñas, L.; Dominguez, E.; Ruiz, J.; Zarazaga, M.; Vila, J.; Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48(10): 3996-4001.
- Sahm, D. F.; Thornsberry, C.; Mayfield, D.C.; Jones, M.E.; Karlowsky, J.A. (2001). Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45(5): 1402-1406.
- Sandberg, T.; Kaijser, B.; Lidin-Janson, G.; Lincoln, K.; Ørskov, F.; Ørskov, I.; Stokland, E.; Svanborg-Edén, C. (1988). Virulence of *Escherichia coli* in relation to host factors in women with symptomatic urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.** 26(8): 1471-1476.
- Schlager, T.A.; Hendley, J.O.; Bell, A.L.; Whittam, T.S. (2002). Clonal diversity of *Escherichia coli* colonization stools and urinary tracts of young girls. **Infect. Immun.** 70(3): 1225-1229.
- Schilling, J.D.; Mulvey, M.A.; Vincent, C.D.; Lorenz, R.G.; Hultgren, S.J. (2001). Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. **J. Immun.** 166: 1148-1155.

- Shrikhande, S.N.; Chande, C.A.; Pathak, A.A. (1999). Virulence factors in uropathogenic *E. coli*. **Indian. J. Pathol. Microbiol.** 42(3): 321-325.
- Schwartz, D.C.; Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Nucleic. Acids. Resarch.** 12:5647-5664.
- Silveira, W.D.; Benetti, F.; Lancellotti, M. (2001). Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Re. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 46(6): 303-310.
- Sobel, J.D.; Kaye, D. (2000). **Urinary Tract Infectious.** In: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. (Ed.) **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.** 5 ed. Vol.2. Philadelphia: Churchill Livingstone. pp 773-805.
- Söderblom, T.; Oxhamre, C.; Tostensson, E.; Richter-Dahlfors, A. (2003). Bacterial protein toxins and inflammation. **Scand. J. Infect. Dis.** 35: 628-631.
- Stapleton, A.; Stamm, W.E. (1997). Prevention of urinary tract infection. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** 11: 719-733.
- Stamm, W.E. (2006). Host-pathogen interactions in community-acquired urinary tract infections. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.** 117: 75-84.
- Stamm, W.E.; Norrby, R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **J. Infect. Dis.** 181(S1):S1-S4.
- Svanborg-Edén C. (1986). Bacterial adherence in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Scand. J. Urol. Nephrol.** 20:81-88.
- Svanborg-Edén C.; Hanson, L.A.; Jodal, U. (1976). Variable adhesion to normal urinary tract epithelial cells of *Escherichia coli* strains associated with various forms of urinary tract infection. **Lancet.** 2: 490-492.

- Tenover, F.; Arbeit, R.; Goering, R.; Mickelsen, p.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol.** 33(2):233-239.
- Tenover, F.C. (2001). Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clin. Infect. Dis.**, 33(3):S108-S115.
- Wang, X.; preston, J.F.; Romeo, T. (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesion required for biofilm formation. **J. Bacteriol.** 186(9): 2724-2734.
- Warren, J.W. (1996). **Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections.** In: Mobley, H.L.T and Warren, J.W. (Ed.) **Urinary tract infections. Molecular Pathogenesis and Clinical Management.** Washington DC: ASM Press. pp 3-27.
- Weber, S.; Pfaller, M.A.; Herwaldt, L.A. (1997). Role of molecular epidemiology in infection control. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**11:257-278.
- Xie, J.; Foxman, B.; Zhang, L.; Marrs, C.F. (2006). Molecular epidemiology identification of *Escherichia coli* genes that are potentially involved in movement of the organism from the intestinal tract to the vagina and bladder. **J. Clin. Microbiol.** 44(7): 2434-2441.
- Yamamoto, S.; Tsukamoto, T.; Terai, A.; Kurazono, H.; Takeda, Y.; Yoshida, Y; Yoshida, O.(1995). Distributions of virulence factors in *Escherichia coli* isoalted from urine of cistitis patients. **Microbiol. Immunol.** 39:401-404.

7. ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Dados de identificação**

Título do projeto: Avaliação dos fatores de virulência e tipagem molecular de *Escherichia coli* de infecções do trato urinário feminino

Pesquisador responsável: Fernando Jorge Schreiner

Instituição a que pertence o pesquisador responsável: Universidade de Caxias do Sul

Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1151. Caxias do Sul

Laboratório de Microbiologia Médica Humana. Bloco S, salas 102-104

Telefone para contato: (54) 3218-2100 ramal 2548 ou (51) 98087343

A Sra está sendo convidada para participar desta pesquisa. A sua participação no estudo é totalmente voluntária, estando livre para recusar a tomar parte ou abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem afetar ou pôr em risco o seu atendimento médico. Os objetivos deste estudo são identificar características biológicas da bactéria *Escherichia coli* importantes para o surgimento de infecção urinária, tanto daquela que está causando a infecção, como daquelas presentes normalmente a nível intestinal, local este que pode representar o reservatório desta bactéria. A sua participação nesta pesquisa não apresentará risco à sua saúde e consistirá na aprovação do uso das amostras de urina e fezes previamente coletadas para os exames, as quais serão posteriormente descartadas. Os resultados dos exames de rotina realizados durante o estudo serão enviados ao seu médico, para que ele possa iniciar o tratamento caso seja necessário. Com exceção dessa liberação de resultados, todas as informações obtidas neste estudo serão confidenciais e será assegurado o sigilo sobre sua participação. Esperamos que este estudo traga informações importantes sobre as causas das infecções urinárias de repetição, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa levar a novas perspectivas de prevenção e tratamento dessas infecções. A Sra poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento, contatando com o pesquisador responsável, Fernando J. Schreiner, pelo endereço ou telefones acima citados.

Com base nestas informações eu, _____,
concordo em participar, como voluntária, do projeto de pesquisa acima descrito.

Caxias do sul, ____ de _____ de _____

Nome e assinatura da paciente

Nome e assinatura do responsável por
obter o consentimento

