



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Lucieny de Faria Souza

**Análise fenotípica e genotípica de cepas de *Escherichia coli*
Uropatogênicas (UPEC) isoladas de pacientes da nefrologia do
Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)**

Rio de Janeiro

2018

Lucieny de Faria Souza

**Análise fenotípica e genotípica de cepas de *Escherichia coli*
Uropatogênicas (UPEC) isoladas de pacientes da nefrologia do Hospital
Universitário Pedro Ernesto (HUPE)**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Lucieny de Faria.

Análise fenotípica e genotípica de cepas de *Escherichia coli* Uropatogênicas (UPEC) isoladas de pacientes da nefrologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) / Lucieny de Faria Souza. – 2018.

87 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Escherichia coli* Uropatogênica – Patogenicidade. 2. Fatores de virulência – Genética – Teses. 3. Resistência microbiana a medicamentos – Genética – Teses. 4. Filogenia – Teses. 5. Doenças urológicas – Microbiologia. I. Ignácio, Ana Cláudia de Paula Rosa. II. Damasco, Paulo Vieira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.842.11

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Lucieny de Faria Souza

**Análise fenotípica e genotípica de cepas de *Escherichia coli*
Uropatogênicas (UPEC) isoladas de pacientes da nefrologia do Hospital
Universitário Pedro Ernesto (HUPE)**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 9 de novembro de 2018.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Raphael do Carmo Valente
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio (orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Cíntia Silva dos Santos
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Renata Garcia Costa
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro
2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Aparecida de Faria Souza e Geraldo Luciano de Souza, por sempre me apoiarem em minhas decisões pessoais e profissionais. A minha filha Luíza de Souza Miguel, por me dar força e inspiração a cada dia, principalmente durante este período.

AGRADECIMENTOS

Apresento minha primeira gratidão a Deus por me permitir alcançar todos os objetivos que trilhei para minha vida profissional.

Aos filhos de coração Laura Lindesay e Arthur Lindesay por entender meus momentos de nervosismo e tensão.

Aos Professores Dra. Ana Cláudia Paula Rosa Ignácio e ao Dr. Paulo Vieira Damasco pela orientação, amizade e estímulo.

Aos amigos da equipe do setor de Bacteriologia Geral, pela cumplicidade, amizade e apoio no transcorrer dos experimentos.

Aos amigos Ana Cláudia Machado Pereira e Ana Carolina da Cruz Campos, por me apoiarem e ficarem o tempo todo do meu lado me ajudando com os experimentos, dicas, gráficos e traduções, sempre com muito carinho.

Aos técnicos da disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ pelo apoio técnico, principalmente à Emanuela de Fátima Santos pelas horas dedicadas durante os experimentos, sempre com bom humor e carinho.

Ao primo Marcelo de Souza Nogueira pela amizade e apoio em tudo que faço em minha vida pessoal e profissional.

Aos amigos Diogo Bellinato, Lívia Rodrigues, Stefanie Vieira, Ligia Oliveira e Juliana Lourenço pela amizade, carinho e apoio.

À secretária Carla Freitas por todo profissionalismo, carinho e compreensão em momentos de dúvidas.

E a todos os familiares e amigos que compreenderam minha ausência durante estes últimos meses e me apoiaram em todos os momentos que precisei de amparo.

Os sonhos não determinam o lugar que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.

Augusto Cury

RESUMO

SOUZA, Lucieny de Faria. *Análise fenotípica e genotípica de cepas de Escherichia coli Uropatogênicas (UPEC) isoladas de pacientes da nefrologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)*. 2018. 87 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A invasão de bactérias capazes de causar cistite e/ou pielonefrite caracteriza a ITU. A *Escherichia coli* é a principal espécie bacteriana associada a esta infecção, devido a sua importância em causar ITU, e algumas dessa espécie receberam a denominação de UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica). No presente trabalho foram estudadas 11 cepas de UPEC isoladas de urina de pacientes do ambulatório de nefrologia do HUPE, com infecções sintomática ou assintomática. Foi pesquisada a presença de 5 fatores de virulência, através das técnicas de PCR simples e multiplex para verificação dos genes que codificam adesinas P (*pap*), fímbria S (*sfa*), sideroforo (aerobactina- *aer*) e alfa-hemolisinas (*hly*); ilhas de patogenicidade (virulência) através do marcador PAI. Foram avaliados os perfis de resistência a antimicrobianos e a presença dos principais genes de resistência como: *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{KPC} (genes que codificam a produção de enzimas metalobetalactamase); *bla*_{CTX} (que codifica a produção de enzimas betalactamase de espectro ampliado - ESBL) e o gene *oxa-48* (que codifica a produção de OXA-carbapenemase). Para investigarmos a patogênese dessas infecções usamos os testes de aderência e invasão em células VERO onde tivemos 100% de aderência e invasão, assim como a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), como alternativa metodológica para o registro de aderência e invasão de *E. coli* em células VERO. As cepas de UPECs testadas não apresentaram fatores de virulência, ou apresentaram pelo menos um desses fatores. Utilizamos para caracterizar a relação clonal das cepas em estudo a eletroforese de campo pulsado (PFGE) e a relação filogenética pela determinação dos grupos A, B1, B2 e D destes microrganismos, que apresentaram como prevalência de grupos D seguido de B2. A análise em conjunto destes dados contribuiu para determinar, juntamente com a formação de biofilme e a resistência, que não há relação entre si, todos esses parâmetros analisados.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. UPEC. Fatores de virulência. Fatores de resistência; Fosfomicina. Aderência. Invasão. Filogenia

ABSTRACT

SOUZA, Lucieny de Faria. *Phenotypic and genotypic analysis of strains of Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) isolated from patients of nephrology at Pedro Ernesto University Hospital (HUPE)*, 2018. 87 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Invasion of bacteria capable of causing cystitis and / or pyelonephritis characterizes UTI. *Escherichia coli* is the main bacterial species associated with this infection, due to its importance in causing UTI, and some of this species are called UPEC (Uropathogenic *Escherichia coli*). In the present study, 11 UPEC strains isolated from urine of patients from the HUPE nephrology clinic with symptomatic or asymptomatic infections were studied. The presence of 5 virulence factors was investigated through simple and multiplex PCR techniques to verify the genes encoding adhesins P (pap), fimbria S (sfa), sideroforo (aerobactinin) and alpha-hemolysins (hly); islands of pathogenicity (virulence) through the PAI marker. The antimicrobial resistance profiles and presence of the main resistance genes such as blaNDM-1, blaVIM-1, blaIMP-1, blaKPC (genes encoding the production of metalobetalactamase enzymes) were evaluated; blaCTX (encoding ESBL) and oxa-48 gene (which encodes the production of OXA-carbapenemase). To investigate the pathogenesis of these infections, we used the adhesion and invasion tests in VERO cells where we had 100% adherence and invasion, as well as the use of scanning electron microscopy (SEM), as a methodological alternative for the registration of adhesion and invasion of E in VERO cells. The strains of UPECs tested did not present virulence factors, or had at least one of these factors. We used to characterize the clonal relationship of the strains studied in the study of pulsed field electrophoresis (PFGE) and the phylogenetic relationship by determining the groups A, B1, B2 and D of these microorganisms, which presented as a prevalence of groups D followed by B2. The joint analysis of these data contributed to determine, together with the formation of biofilm and the resistance, that there is no relationship between each other, all these analyzed parameters.

Keywords: *Escherichia coli*. UPEC. Virulence factors. Resistance factors. Fosfomicin. adhesion. Invasion. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Diferença de tamanho entre uretra masculina e feminina	22
Figura 2 –	Alguns fatores de virulência que podem ser encontrados em <i>E. coli</i>	30
Figura 3 –	Resultados das análises realizadas pelo método de MALDI-TOF, para identificação das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU. (Continua)	48
Figura 4 –	Resultados das análises realizadas pelo método de MALDI-TOF, para identificação das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU. (Conclusão).....	49
Figura 5 –	Padrões de aderência observados em célula VERO inoculadas com as cepas de <i>E. coli</i> de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=5).....	56
Figura 6 –	Dendograma do PFGE com as cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=10).....	58
Figura 7 –	MEV mostrando a aderência em células VERO das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=4).....	59
Figura 8 –	MEV mostrando a invasão em células VERO das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=4).....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Genes de virulência pesquisados em cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=12)	54
Gráfico 2 – Aderência apresentada em UPEC de pacientes da nefrologia com ITU.....	56
Gráfico 3 – Invasão apresentada em UPEC de pacientes da nefrologia com ITU.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Classe dos antimicrobianos testados nas cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia	41
Quadro 2 –	Genes, sequências iniciadoras e tamanho dos fragmentos amplificados no PCR realizado com as cepas de <i>E. coli</i> isoladas de ITUs.....	42
Quadro 3 –	Resultado do perfil encontrado para os antimicrobianos β - lactâmicos testados nas cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=11).....	50
Quadro 4 –	Resultado do perfil de resistência aos β -lactâmicos testados (n=11)	50
Quadro 5 –	Associação de resistência entre as cepas de <i>E. coli</i> frente a classe dos betalactâmicos (n=11)	51
Quadro 6 –	Resultado do perfil de resistência dos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos; fosforados; fluoquinolonas; glicilciclina; nitrofurano e sulfonamida, encontrados nas cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=11)	52
Quadro 7 –	Associações de resistência aos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos; fosforados; fluoquinolonas; glicilciclina; nitrofurano e sulfonamidas (n=11)	52
Quadro 8 –	Similaridade entre as resistências das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=11)	53
Quadro 9 –	Percentual de grupo filogenético das 11 cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=11).	55
Quadro 10 –	Classificação do biofilme de acordo com a densidade ótica (DO) (n=11)	58

Quadro 11 – Correlação sexo, idade, grupos filogenéticos, resistência aos antimicrobianos não β -lactâmicos e β -lactâmicos, genes de resistência e virulência, biofilme, aderência e invasão 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de nível de confiança na identificação das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU, utilizando o MALDI-TOF (n=15)	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Era	Gene que codifica a proteína usada na metabolização de ferro
AmpC	Lactamase classe C
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
PB	Pares de bases
CBI	Comunidade bacteriana intracelular
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMY	pAmpC mais comumente encontrada entre membros da família <i>Enterobacteriaceae</i>
CO ₂	Gás carbônico
D-MEM	Dulbecco Meio Essencial Mínimo
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
GL	Gay Lussac
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
Hly	Sequência do gene que codifica a produção de α - hemolisina
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IMP	Imipenemase
ITU	Infecção do Trato Urinário
K ₃ [Fe (CN) ₆]	Ferricianeto de Potássio
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de Carbapenemase
LIA	Lisina Descarboxilase Agar
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
MEM	Meio Essencial Mínimo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NDM	New Delhi Metallo-beta-lactamas
OsO ₄	Tetróxido de Ósmio
OXA-48	OXA-carbapenemases

Pai	Sequência do gene que codifica as Ilhas de Patogenicidade
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-D	Phosphate Buffered Saline Dulbecco Modifield
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Eletrophoresis
RNA _t	Ácido ribonucleico transportador
Sfa	Gene que codifica a fímbria S
SFB	Soro Fetal Bovino
SHV	Sulfidrilvariável
SIM	Sulfeto de Hidrogênio/Indol/Motilidade
TEM	Temoniera
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
TSB	Tryptic Soy Broth
TSI	Tríplice açúcar Iron
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
VEROS	Células epiteliais de rins de Macaco Verde Africano
VIM	Verona Imipenemase
PBS	PBS Phosphate Buffered Saline
PBS-D	Phosphate Buffered Saline Dulbecco Modifield

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
b	Pares de base
®	Marca registrada
µg	Micrograma
G	Gramma
Pa	Pressão atmosférica
mL	Mililitro
°C	Graus Célsius
B	Beta
Min	Minuto
m/z	Massa/carga
H	Hora
µ	µ média
δ2	Desvio padrão

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1	Morfofisiologia renal	21
1.2	Infecção do trato urinário (ITU)	22
1.3	Família <i>Enterobacteriaceae</i>	24
1.4	<i>Escherichia coli</i>	24
1.5	Fatores de virulência	25
1.6	Adesinas fimbriais de <i>E. coli</i>	27
1.7	Proteínas ligantes de ferro	28
1.8	Ilhas de patogenicidade	29
1.9	Biofilme	30
1.10	Resistência bacteriana aos antimicrobianos	31
1.10.1	<u>Genes de resistência a antimicrobianos</u>	32
1.10.2	<u>β-Lactamases</u>	32
1.10.3	<u>Cetotaximase</u>	33
1.10.4	<u>Carbapenemases</u>	34
1.10.5	<u><i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC)</u>	34
1.10.6	<u>New Dehli Metallo-β-lactamase</u>	35
1.10.7	<u>Verona Imipenemase (VIM)</u>	35
1.10.8	<u>Imipenemase (IMP)</u>	35
1.10.9	<u>Carbapenemase hidrolizante de oxacilina</u>	36
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAS E MÉTODOS	39
3.1	Cepas	39
3.2	Confirmação da identificação das cepas de <i>E. coli</i> por MALDI-TOF	40
3.3	Determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e sensibilidade a fosfomicina	40

3.4	Reação em cadeia da polimerase para genes de virulência, genes de resistência antimicrobiana e agrupamento filogenético de UPEC.....	41
3.5	Ensaio de aderência com <i>E. coli</i> utilizando linhagem celular VERO	43
3.6	Ensaio de invasão com <i>E. coli</i> usando linha de células VERO.....	43
3.7	Ensaio de formação de biofilme semi-quantitativo	44
3.8	Análise da Diversidade Genômica Bacteriana	45
3.9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Confirmação da identificação das cepas de <i>E. coli</i> por MALDI-TOF	47
4.2	Determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e sensibilidade a fosfomicina.....	50
4.3	Reação em cadeia da polimerase para genes de resistência, genes de virulência aos antimicrobianos e agrupamento filogenético de UPEC.....	53
4.3.1	<u>Genes de resistência</u>	53
4.3.2	<u>Genes de virulência</u>	53
4.3.3	<u>Agrupamento filogenético</u>	55
4.4	Ensaio de aderência com <i>E. coli</i> utilizando linhagem celular VERO	55
4.5	Ensaio de invasão com <i>E. coli</i> usando linha de células VERO.....	57
4.6	Ensaio de formação de biofilme semi-quantitativo	57
4.7	Análise da Diversidade Genômica Bacteriana	58
4.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59
4.9	Análise da correlação dos parâmetros estudados	60
	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS	70

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) de acordo com autores e dados clínicos, é o microrganismo mais isolado nos casos de infecções do trato urinário (ITU) (WURPEL *et al.*, 2016). A incidência de ITU é quatro vezes maior nas mulheres em comparação com os homens. Estima-se que 50% das mulheres experimentam pelo menos uma ITU durante a sua vida, geralmente uma ITU não complicada (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015). Infecções urinárias causadas por *E. coli* tipicamente ocorrem em pacientes idosos, sendo a idade um dos mais importantes fatores de risco. Essa faixa etária pode apresentar alterações no trato geniturinário, além de fatores hormonais e imunológicos alterados e a co-morbidades como: diabetes, incontinência urinária e fecal. O uso de fraldas geriátricas pode facilitar a contaminação do trato urinário por micro-organismos (NICOLLE, 2001; OMLI *et al.*, 2010; CDC, 2012).

A infecção do trato urinário inferior, chamada de cistite, origina-se quando microrganismos do trato gastrointestinal invadem o trato urinário. A diferença de prevalência entre os gêneros diminui após 65 anos nas infecções da comunidade. Em mulheres no período de pós-menopausa a ITU é comum e recorrente (OLIVEIRA; SANTOS, 2018). As infecções urinárias podem ocorrer em pacientes ambulatoriais ou internados, mas os fatores de risco e o perfil de resistência aos antimicrobianos são diferentes entre infecções comunitárias quando comparadas com as infecções hospitalares (SALTOGLU *et al.*, 2015). O processo de patogenicidade das cepas de UPEC envolve muitas etapas, mas as mais importantes são a aderência e invasão de células uroepiteliais (BARBER *et al.*, 2013).

As cepas de UPEC que causam infecções apresentam fatores de virulência que podem aumentar a capacidade de sobreviver e colonizar o trato urinário. O biofilme se apresenta como um dos fatores relacionados à patogenicidade (PARSEK; SINGH, 2004). Além disso, a formação de biofilme é importante para o processo de infecção por UPEC e vários genes estão envolvidos na formação dessa estrutura (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

A *E. coli* é uma espécie geneticamente diversificada que causa doenças diarreicas e uma multiplicidade de infecções extra-intestinais. Esses fatores genéticos associados às fímbrias, mecanismos de regulação, resistência à antimicrobianos,

dentre outros cumprem muitos ou todos os critérios propostos para a associação de biofilme em infecções (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; REISNER *et al.*, 2006).

E. coli pode ser agrupada através do seu genótipo em grupos filogenéticos. O grupo filogenético mais prevalente nas cepas patogênicas extra-intestinais de *E. coli* é o grupo filogenético B2, seguido pelo grupo D. Os grupos A e B1 são classificados como bactérias comensais, que demonstram infecção extra-intestinal. Essa distribuição em filogrupos e sua inter-relação com a patogenicidade pode variar com fatores como localização geográfica dos indivíduos (JOHNSON *et al.*, 2002; CHAKRABORTY *et al.*, 2015; MARTINEZ *et al.*, 2000).

A observação de todas as fases do mecanismo de patogenicidade envolvidos na interação da bactéria com a célula hospedeira pode ser registrada por técnicas diversas de microscopia. Uma técnica importante de registro é a microscopia eletrônica de varredura (MEV) que permite a análise tridimensional das alterações induzidas pelo microrganismo na superfície celular (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A Microscopia Eletrônica Varredura permite observações diretas das estruturas poliméricas, tendo como vantagem ser um método simples de preparação na maioria dos casos (MAYRHOFER *et al.*, 2006).

Pode ser usada para observação de morfologia 'externa' dos microrganismos, localização de microrganismos em diversos materiais, e permite a análise tridimensional das alterações induzidas pelos microrganismos nos materiais (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O presente estudo tem como objetivo relacionar características de cepas UPEC isoladas de pacientes apresentando ITU, oriundos do setor de nefrologia do Hospital Pedro Ernesto (HUPE). Tal objetivo engloba análises fenotípicas e genotípicas para detecção de fatores de virulência e resistência, determinação dos grupos filogenéticos, aderência e invasão em células VERO, formação de biofilme, diversidade genômica e o uso da microscopia eletrônica de varredura para registro do mecanismo de invasão em células VERO pelas cepas estudadas. O crescimento da população idosa com ITU causada por UPEC foi de suma importância para o desenvolvimento deste trabalho, pois proporcionará subsídios para a elaboração de estratégias para o controle e prevenção das infecções urinárias por UPEC, bem como para a compreensão dos processos de interação com o hospedeiro e disseminação

virulência e resistência a antimicrobianos entre cepas relacionadas infecção de pacientes nefropatas e idosos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Morfofisiologia renal

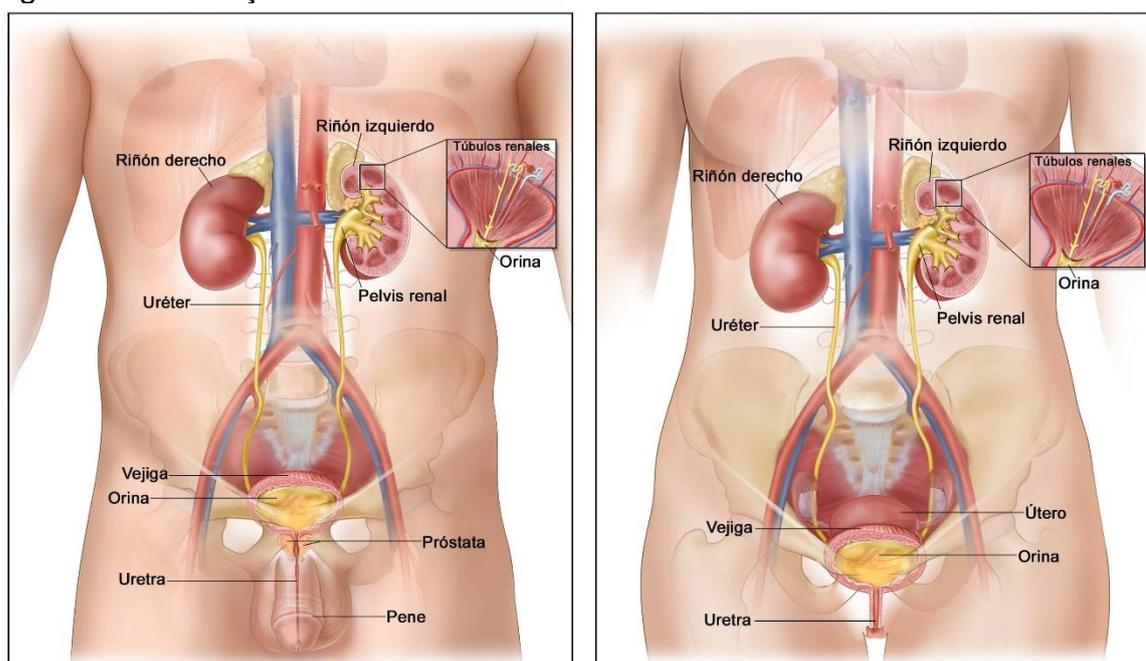
A regulação homeostática da água tem como finalidade modular o conteúdo iônico do sangue, também chamado de balanço eletrolítico, hídrico ou balanço de sal e água. Além de manter o equilíbrio, regula o pH, osmolaridade, volume do líquido extra-celular, pressão sanguínea e produção hormonal (SILVERTHORN, 2010; JUC *et al.*, 2011).

O sistema urinário é formado por: dois rins (produzem a urina); ureteres (que saem dos rins e chega na bexiga, conduzindo a urina dos rins até a bexiga); bexiga (armazena a urina); uretra (conduz a urina da bexiga para fora do corpo) (JUC *et al.*, 2011).

Os rins possuem a formato de grão de feijão, localizando-se na região lombar, nos dois lados da coluna vertebral. Produzem a urina, que é definida com um líquido que contém uma variedade de substâncias, onde estas são produtos gerados durante o metabolismo celular, para serem eliminados pelo trato urinário (HALL, 2012).

A bexiga armazena a urina, quando se enche. Por uma ação reflexa, se contrai e expulsa a urina para a uretra (SILVERTHORN, 2010; HALL, 2012). A uretra nas mulheres é uma abertura localizada na porção anterior à abertura da vagina. Nos homens é classificada como uma estrutura acessória que sai do corpo do pênis, como mostra a Figura 1. A extensão mais curta da uretra nas mulheres e sua proximidade com o ânus aumentam a probabilidade de risco de uma infecção do trato urinário no sexo feminino (SILVERTHORN, 2010; HALL, 2012).

Figura 1 - Diferença de tamanho entre uretra masculina e feminina



Fonte: Instituto Nacional del Cáncer, 2016.

1.2 Infecção do trato urinário (ITU)

O trato urinário pode ser dividido em duas partes: superior (rim, pelve renal e ureteres) e a parte inferior (bexiga e uretra). Quando as infecções acometem as vias urinárias, estas são comumente ascendentes e se originam na bexiga ascendendo pelos ureteres em direção aos rins. Alguns indivíduos possuem anomalias urogenitais, hiperdistensão da bexiga por obstrução de efluxo, disfunção neurogênica ou pressão de um útero gravídico. Essas condições causam refluxo da urina dos ureteres para a bexiga levando a ITU. As infecções na pelve renal (pielite) e rins (pielonefrite) são consideradas complicações mais comuns, podendo ser agudas ou recorrentes, associadas ao processo inflamatório (WINN JUNIOR *et al.*, 2008; TINOCO *et al.*, 2018).

São relatadas como ITU, infecções bacterianas, sendo essas infecções mais recorrentes no ser humano especialmente no sexo feminino, devido à invasão de agentes infecciosos nos tecidos urinários. De acordo com a localização, pode ser classificada como infecção urinária baixa ou alta. A presença de bactérias na urina (bacteriúria) pode ser assintomática, onde podemos ter um isolamento de bactérias

de 10^5 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), sem nenhum sinal ou sintoma local ou sistêmico (GUERRA *et al.*, 2012; CARVALHO, 2015; TINOCO *et al.*, 2018).

As mulheres possuem maior susceptibilidade às infecções urinárias. Matematicamente podemos estimar que 10 a 20% das mulheres podem vir a ter ITU em algum momento de sua vida (SALTON; MACIEL, 2017). ITU também é uma infecção frequente entre mulheres durante o período gestacional. Durante a gravidez, a mulher sofre mudanças fisiológicas (mecânicas e hormonais), fazendo com que o organismo fique mais vulnerável com relação ao crescimento de cepas microbianas, facilitando o desenvolvimento da ITU durante este período. A combinação entre ITU e a gestação muitas das vezes pode ocasionar uma gravidez com complicações como óbito perinatal ou recém-nascidos de baixo peso (CARVALHO, 2015).

As infecções do trato urinário podem não evoluir para complicações, e na maioria das vezes ocorrem em mulheres saudáveis e são causadas geralmente por *Escherichia coli*. Essa infecção pode ocorrer por combinação anatômica, metabólica ou por anormalidades do trato urinário que podem inativar a resposta imune inata do hospedeiro causando uma lesão tecidual. Indivíduos com infecções sintomáticas apresentaram cultura com o resultado de $\geq 10^5$ bactérias/mL (LEE; NEILD, 2007; ANVISA, 2013).

Infecções urinárias adquiridas na comunidade em sua maioria são causadas por bactérias da microbiota intestinal, sendo as mais frequentes: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. Já em mulheres jovens são isolados mais comumente em infecção urinária o *Staphylococcus saprophyticus*. No ambiente hospitalar, as infecções urinárias normalmente estão associadas ao uso de cateteres ou a procedimentos cirúrgicos, sendo a bactéria mais frequente nesses casos a *Escherichia coli* seguida por outras enterobactérias e por *Pseudomonas aeruginosa*. Bactérias anaeróbias também podem ser encontradas (TRABULSI, 1991; SALTON; MACIEL, 2017).

Infecções urinárias consideradas significativas tem um crescimento bacteriano igual ou superior a 100.000 UFC/mL de urina, independentemente do microrganismo isolado (CARDOSO; SILVA, 1989; ANVISA, 2013; SALTON; MACIEL, 2017).

1.3 Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* engloba bactérias isoladas com maior regularidade de cepas biológicas. Com ampla distribuição no ecossistema, essa família está no solo, água, plantas e no trato intestinal de seres vivos. Pouco antes da invenção dos antibióticos, da quimioterapia e das medidas imunossupressoras, as doenças infecciosas causadas por *Enterobacteriaceae* já eram bem definidas (RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2018).

Pacientes que possuem Síndrome da Imunodeficiência ou debilitados tem maior susceptibilidade às infecções recorrentes de hospitais, depois de colonização com cepas ambientais ou contaminados a partir de intervenções invasivas, como cateterismo, broncoscopia, colposcopia ou biópsias cirúrgicas, onde as membranas mucosas são cortadas ou traumatizadas (WINN JUNIOR *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2018).

1.4 *Escherichia coli*

A *E. coli* foi inicialmente denominada como *Bacterium coli* no final do século XIX, por ser um micro-organismo encontrado no cólon do homem e de animais. Durante boa parte do século XX, foi relacionada com a contaminação proveniente das fezes. Nas últimas décadas foi comprovado seu alto grau de patogenicidade para o homem, provocando graves infecções e em alguns casos podendo levar ao óbito (GERMANO; GERMANO, 2001).

E. coli é um micro-organismo pertencente ao domínio *Bacteria*, filo e classe *Proteobacteria*, subclasse *Gammaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales*, família *Enterobacteriaceae* (MURRAY *et al.*, 1999). São bastonetes Gram negativos (BGN), catalase-positivos e oxidase-negativos (não possuem a enzima citocromo-oxidase), fermentam glicose, não geram esporos, considerados anaeróbios facultativos e capazes de reduzir nitrato a nitrito. São classificados como mesófilos típicos e apresentam capacidade de desenvolvimento em temperaturas entre 7°C e 46 °C, com temperatura ótima de crescimento a 37 °C, não sendo termoresistentes, podendo ser

destruídas com facilidade numa temperatura de 60 °C, em segundos. As condições ótimas para seu desenvolvimento são o pH próximo do neutro mas podem se multiplicar em pH abaixo de 4,4 (GERMANO; GERMANO, 2001).

1.5 Fatores de virulência

A capacidade de um agente causar infecção é conhecida como patogenicidade. Patógenos podem causar sintomas em maior ou menor proporção, quando instalado no organismo humano ou animal. Em condições adequadas são aqueles que podem causar enfermidades. O nível de patogenicidade de um microrganismo é chamado de virulência. A virulência não é relacionada com apenas um fator, mas depende de vários fatores relacionados ao microrganismo, ao hospedeiro e toda a interação entre ambos. Dois atributos principais da virulência são a capacidade de iniciar uma infecção e a gravidade da infecção (infeciosidade). Isso permite caracterizar as cepas de acordo com o seu grau de virulência: alto, médio ou sem virulência também chamada de avirulenta, quando correlacionada a um gênero ou espécie de microrganismos que normalmente são patogênicos (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Parte determinante para a evolução de infecção no hospedeiro são os fatores de virulência. Os responsáveis pela codificação dos fatores são os genes presentes em locais variados, como cromossomos, material genético derivado de bacteriófagos, plasmídeos ou ilhas de patogenicidade (JOHNSON; STELL, 2000; MÜHLIDORFER; ZIEBUHR; HACKER, 2001; DONNENBERG; WHITTAM, 2001; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2018).

As características relacionadas à virulência frequentemente são codificados em ilhas de patogenicidade (PAIs), presentes normalmente no cromossomo da bactéria. Sua transmissão decorre da transferência horizontal de genes entre linhagens distintas e até mesmo entre espécies diferentes (BOYD; HARTL, 1998; DONNENBERG; WHITTAM, 2001; SOUZA *et al.*, 2016). São partes longas de DNA cromossomal, variando de 5 a 200kb, possuindo um grupo de genes relacionados com a virulência que estão estabelecidos dentro ou perto do gene codificando um RNA; PAIs se distinguem por serem áreas inconstantes e mostram um determinado

conteúdo C+G que as difere do restante do genoma bacteriano (HACKER *et al.*, 1997; SCHMIDT *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2016).

Cepas de *E. coli* com determinadas classes de PAI relacionadas a produção de pielonefrite fazem parte de uma quantidade reduzida de sorotipos. Tais cepas apresentam PAI com diversos genes que codificam propriedades relacionadas à virulência como fímbrias, sideróforos e produção de toxinas como a hemolisina, todos encontrados normalmente nessas ilhas de patogenicidade. As cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com ITU complicada apresentam prevalência diminuída quando relacionadas com as cepas de *E. coli* isoladas de ITU não complicada (NICOLLE, 2001).

Os fatores de virulência das UPEC podem ser separados em duas categorias: fatores de virulência relacionados à superfície da célula bacteriana e fatores de virulência que são secretados no sítio de ação (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2018).

Em relação à primeira categoria de fatores, podemos observar que a virulência está relacionada à estrutura que viabiliza a ligação da bactéria aos tecidos do trato urinário, como as fímbrias e adesinas. A fímbria tipo I é correlacionada com as ITU baixo, e a fímbria P, relacionada com as ITU alto (pielonefrite). Quando o assunto é patogênese da ITU, as fímbrias e adesinas são de grande importância, pois elas contribuem para a junção das bactérias e células uroepiteliais, no início do processo que pode progredir para infecção urinária (OLIVEIRA *et al.*, 2011; PITOUT, 2012; BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2018;).

O segundo grupo tem como integrantes as toxinas, que contribuem significativamente na colonização do tecido uroepitelial, por provocar uma resposta inflamatória local, fazendo surgir os primeiros sinais e sintomas. Com destaque para alfa-hemolisina e os sistemas de captação de ferro, como a aerobactina (MIDDENDORF *et al.*, 2001; YAMAMOTO, 2007; WILES *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011; BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; LARA *et al.*, 2017; PITOUT, 2012).

1.6 Adesinas fimbriais de *E. coli*

A habilidade de aderência bacteriana é vista como um passo fundamental para estabelecimento no hospedeiro e início da infecção. As adesinas, fundamentais para a patogênese, normalmente estão localizadas na extremidade das fimbrias, chamadas de apêndice filamentosos, que estão presentes na superfície da bactéria (BAHRANI-MOUGEOT *et al.*, 2001; WELCH *et al.*, 2002; LARA *et al.*, 2017).

Os dois tipos de fimbria vistos com mais frequência em isolados bacterianos de *E. coli* são a fimbria do tipo 1 (manose-sensível) e fimbria P (manose-resistente), estas são morfologicamente semelhantes, mas se diferem pela capacidade de mediar a hemaglutinação na existência de manose, sendo a característica mais evidente em cepas de UPEC (SVANBORG; GODALY, 1997; BABY; KARNAKER; GEETHA, 2018).

A fimbria tipo I é expressa pela maior parte das espécies de *E. coli* (FRENCH, 2006; ZHENG *et al.*, 2017) e é significativa para a caracterização de virulência. Existe um predomínio dos gêneros da família *Enterobacteriaceae* apresentando este tipo de fimbria, que se associa a oligossacarídeos de manose (MARTINEZ *et al.*, 2000; SALYER; WHITT, 2002; ZHENG *et al.*, 2017).

Conforme descrito por Johnson (1991), as fimbrias aglutinam eritrócitos de espécies distintas de animais e se aderem em células. A fimbria tipo 1 possui atividade hemaglutinante a uma temperatura de 4°C.

As fimbrias são constituídas de filamentos helicoidais de um comprimento de 1-2nm e com um diâmetro de 7nm, composta por repetidas subunidades de proteína estrutural FimA aderidas a arranjos de 3nm de largura que possuem adesina FimH (JONES *et al.*, 1995). A colonização da bexiga por cepas de *E. coli* que leva a casos de cistite é feita quando a adesina FimH se liga aos receptores manosilados presentes no urotélio (LANGERMANN *et al.*, 1997; THANKAVEL *et al.*, 1997; WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007; ZHENG *et al.*, 2017).

A fimbria do tipo P é codificada pelo operon *pap* (*pili* relacionada à pielonefrite), que pode estar presente em um ou mais componentes genéticos móveis (RASKO *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2017). Essa fimbria é formada por uma subunidade maior, conhecida por PapA, que constrói a estrutura da fimbria, e três subunidades menores, PapE, PapF e PapG, que se dispõem na extremidade da mesma (JOHNSON, 1991; OELSCHLAEGER *et al.*, 2002).

As fímbrias contribuem para a formação de biofilme bacteriano, que são comunidades bacterianas intracelulares (CBIs), que atuam como um depósito quiescente do patógeno, servindo como proteção contra os mecanismos de defesa inata e tratamento com antimicrobianos. O biofilme também perpetua a permanência da bactéria no epitélio e serve também como fonte para ITU subsequente (JUSTICE *et al.*, 2006).

A molécula de adesina S, é uma proteína de 12 quilodaltons (kDa) relacionada à sequência do gene *sfaA*, que codifica para a subunidade de proteína fímbrial S. A família de adesinas é constituída pela fímbria S (Sfa), e esta possui dois subtipos: Sfa-I e Sfa-II. As adesinas fímbriais S são frequentemente expressas em estirpes de UPEC isoladas de humanos (HACKER *et al.*, 1993; SANTOS, 2018). A sequência de um receptor contendo α -sialyl-2-3- β -lactose, são reconhecidas pelas fímbrias S, sendo expressas principalmente por estirpes que causam infecções nas meninges e septicemia. As que causam infecção urinária também podem reconhecer estes receptores (KORHONEN *et al.*, 1985).

Os determinantes *sfa* de diferentes estirpes têm uma alta homologia de sequência, e possuem também uma relação com um outro aglomerado de genes (*foc*), que codifica para a FIC fímbrias. Em contraste com a Sfa, as fímbrias FIC não são capazes de aglutinar eritrócitos (OTT, 1988; SANTOS, 2018).

1.7 Proteínas ligantes de ferro

A hemolisina recebeu este nome por lisar as hemácias e sua expressão está associada a cepas patogênicas de *E. coli*, principalmente em UPEC que causam infecções urinárias seVEROs. Acredita-se que a atividade pró-virulenta da hemolisina pode ser multifatorial, incluindo o desprendimento de ferro dos eritrócitos, a destruição dos fagócitos, e a toxicidade direta ao tecido do hospedeiro (JOHNSON, 1991; OSTOLAZA *et al.*, 1991; RASKO, *et al.*, 2001; MARRS *et al.*, 2002; BABY; KARNAKER; GEETHA, 2018). Johnson (1991) relatou que em estudo com ratos, a alfa-hemolisina produzida pelo gene *hly* possui a capacidade de provocar danos no epitélio urinário e induzir hemorragia na bexiga durante os estágios iniciais de cistite mediada por *E. coli*.

As bactérias possuem algumas necessidades nutricionais, sendo uma delas, a metabolização dos íons ferro. Os sideróforos são compostos de peso molecular baixo, que possuem alta afinidade pelo ferro. O complexo sideróforo-ferro se faz necessário, pois o ferro é insolúvel em pH fisiológico, portanto, sozinho, ele não consegue passar entre as células, precisando de ajuda. Quando uma bactéria penetra no hospedeiro e inicia um processo infeccioso, há um aumento na produção de proteínas que sequestram uma grande quantidade de ferro, deixando poucos íons livres para a bactéria. Desta forma, as bactérias não conseguem competir com o hospedeiro pelo ferro livre, possuindo assim, pouca patogenicidade, enquanto, as que produzem sideróforos permitem que este seja internalizado pela célula bacteriana, após a ligação com receptores específicos, captando íons ferro (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009; SANTOS, 2018; LARA *et al*, 2017).

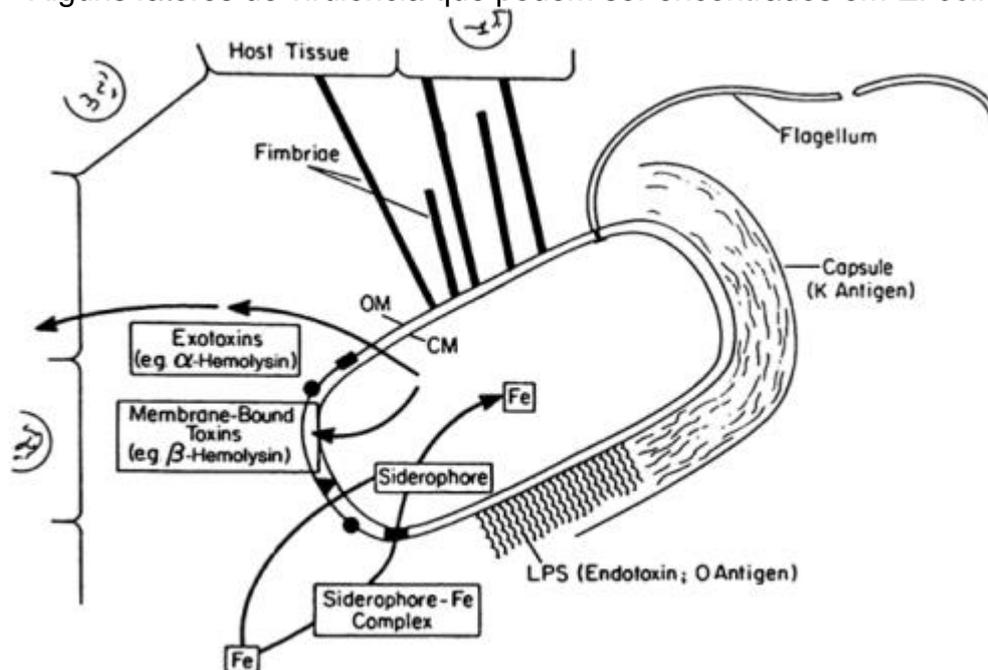
A aerobactina é um sideróforo prevalente na família *Enterobacteriaceae*. Seus genes estão situados em plasmídeos ou cromossomos (BLANCO *et al.*, 1997). São produzidos por proteínas do tipo: lucD, lucB, lucA e lucC, que se expressam em um operon (iucABCD). O controle transcricional do sideróforo é regulado pela mínima concentração de ferro intracelular sendo ativado em concentrações baixas de ferro (TROXELL; HASSAN, 2013; LARA *et al*, 2017; SANTOS, 2018).

1.8 Ilhas de patogenicidade

Em 1997, Hacker e colaboradores criaram o conceito de Ilhas de Patogenicidade (PAI), quando estudavam virulência em UPEC. As Ilhas são grandes elementos genéticos móveis (formados por grandes cadeias de DNA (>30kb), localizados junto a genes de RNAt, com elevado conteúdo de G+C), que possuem propriedades diferentes do restante do genoma bacteriano e apresentam pelo menos um gene associado à patogenicidade, e são capazes de codificar alguns fatores de virulência, além de codificarem também parte ou todo conjunto molecular para que esses fatores de virulência consigam alcançar o alvo na célula hospedeira (HACKER *et al.*, 1997; TISSIANI *et al.*, 2018).

A Figura 2 mostra alguns dos fatores de virulência já citados neste trabalho (HACKER; KAPER, 2000; SCHMIDT; HENSEL, 2004; VIEIRA, 2009).

Figura 2 - Alguns fatores de virulência que podem ser encontrados em *E. coli*



Legenda: OM: membrana externa; CM: membrana citoplasmática, LPS: lipopolissacarídeos; Fe: íon de ferro.

Fonte: Johnson, 1991.

1.9 Biofilme

A formação de comunidades bacterianas sem uma superfície é um processo que contribui para a patogenicidade de microrganismos (PARSEK; SINGH, 2004). Há uma hipótese de que a persistência de biofilmes bacterianos no corpo humano é uma das causas fundamentais de se ter infecções recorrentes ou crônicas (REISNER, 2006). Um papel importante para a formação de biofilmes bacterianos na patogênese é bem determinado para um número de infecções e patógenos oportunistas; para outros tipos de infecções, uma ligação entre biofilmes e a doença tem sido proposta, mas a comprovação ainda permanece obscura.

O biofilme é caracterizado pela adesão de microrganismos em uma superfície, havendo produção de substâncias poliméricas extracelulares (matriz). É definido como um sistema biológico formado por comunidades de células reunidas, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular, a qual permite a

possibilidade de aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas (BJARNSHOLT, 2013; DIEDRICH, 2017).

A *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) forma comunidades multi-celulares na superfície dos materiais do cateter, paredes da bexiga, bem como dentro das células epiteliais da bexiga. O biofilme impede que o tratamento das ITUs funcione, pois protege as bactérias tanto da resposta imune do hospedeiro quanto da terapia antimicrobiana (DIEDRICH, 2017).

1.10 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

Um fator de grande relevância em estudos biológicos e epidemiológicos é a resposta das bactérias aos antimicrobianos, já que muitas razões podem provocar a mudança de sensibilidade dos microrganismos, como exemplos temos a seleção natural, mutação e recombinação genética. A seleção do antimicrobiano apropriado é feita baseada no conhecimento da identidade do microrganismo e da sensibilidade aos antimicrobianos dele no sítio de infecção, e fatores ligados ao paciente, como o custo/ benefício da terapia. O seu uso pode ser feito de forma empírica, definitiva ou preventiva, também conhecida como profilática. Na terapia empírica ou inicial o uso dos antimicrobianos deve cobrir o máximo de microrganismos prováveis (Gram-positivos e Gram-negativos), uma vez que o patógeno, ou patógenos, causadores da infecção ainda não foram corretamente identificados, esta terapia pode ser realizada com mais de um antimicrobiano (terapia combinada) ou com um antimicrobiano (monoterapia), sendo utilizada com agentes de espectro amplo. Depois da identificação do microrganismo a terapia antimicrobiana utilizada passa a ser a definitiva com espectro estreito e baixa toxicidade, esta terapia é baseada no resultado do antibiograma (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009; PATHAK *et al.*, 2017).

A classificação mais utilizada é baseada em sua estrutura química e no mecanismo de ação. Além dos fatores já mencionados, é de extrema importância determinar a concentração apropriada de antimicrobiano, para atingir um efeito mínimo da droga (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2003).

Uma das formas de utilização de antimicrobiano é na profilaxia, em casos de cirurgias ou extrações dentárias, porém a escolha não é feita baseada somente na

atividade contra o microrganismo ou microrganismos infectantes mais prováveis, também é levada em conta a toxicidade e possíveis reações alérgicas no paciente que utilizará a terapia. Nos casos que já existe uma infecção em curso, a melhor escolha passa pela realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), ainda que realizemos verificações *in vitro*, conseguimos uma resposta mais precisa para a terapia mais eficiente contra determinadas cepas de microrganismos (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Os antimicrobianos utilizados para o tratamento de ITU são: beta-lactâmicos, sulfametoxazol-trimetoprim, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, são as drogas habitualmente prescritas para infecções deste tipo (ARSLAN *et al.*, 2005; CLSI, 2018).

1.10.1 Genes de resistência a antimicrobianos

Os genes de resistência aos antimicrobianos podem ser adquiridos por transmissão de material genético ou através de mutação (VEIGA, 1984; RICE; BONOMO, 2005; ROCCHETTI, 2010; TISSIANI *et al.*, 2018). A resistência aos antimicrobianos pode acontecer através de dois mecanismos: a mutação num *loci* do cromossoma ou a transferência horizontal de genes. As mutações cromossômicas envolvem modificações nos sítios de ação dos antimicrobianos, alterando a ligação destes ao alvo nas bactérias. Na transferência horizontal gênica, há a aquisição de genes de resistência anteriormente presentes em outros microrganismos (DŽIDIĆ; ŠUŠKOVIĆ; KOS, 2008; ROCCHETTI, 2010). A presença de genes de resistência em plasmídeos é responsável por codificarem enzimas que inutilizam os antimicrobianos ou diminuem a capacidade de passagem pela célula bacteriana (permeabilidade) (NEIDHARDT, 2004; ROCCHETTI, 2010).

1.10.2 β -Lactamases

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas produzem as enzimas β -lactamases que quebram o anel betalactâmico por hidroxilação irreversível da ligação

amida, inativando assim o antimicrobiano. Além das penicilinas, existem vários outros substratos que as enzimas β -lactamases podem atuar, como as cefalosporinas (GIURIATTI, 2017; BUSH; FISHER, 2011). Existem também os chamados inibidores de beta-lactamases, que são utilizados para ampliar o espectro das penicilinas na eliminação dos microrganismos produtores de β -lactamases, são eles: ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Estes inibidores possuem estrutura idêntica à estrutura da penicilina, modificada apenas na cadeia lateral, deixando o antimicrobiano disponível para atuar na causa da infecção (WILLIAMS, 1999; GIURIATTI, 2017).

As β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) são enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar todos os antimicrobianos β -lactâmicos, exceto as cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) e os carbapenênêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem), também são inibidas por ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; LAVAGNOLI *et al.*, 2017). No sítio de ação, as ESBL possuem um resíduo de serina, e essas, são codificadas por genes encontrados nos plasmídeos que também podem codificar resistência aos antimicrobianos das classes dos: aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas e sulfametoxazol/trimetoprim (WINOKUR *et al.*, 2001; ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008). Existem inúmeras ESBLs, sendo as mais comuns entre a família *Enterobacteriaceae* as: SHV, TEM e CTX-M (HARADA; ISHII; YAMAGUCHI, 2008; LAVAGNOLI *et al.*, 2017).

1.10.3 Cetotaximase

As enzimas β -lactamases do tipo cefotaximase (CTX) possuem sua codificação feita pelo gene *bla_{CTX-M}* que se localiza nos plasmídeos. Essas enzimas conferem resistência a todas as cefalosporinas de espectro ampliado, e podem possuir como substratos preferenciais a cefotaxima e a ceftriaxona (BONNET, 2004; CARTELLE *et al.*, 2004; ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008; ROCCHETTI, 2010). No ano de 1990 a Alemanha, teve o primeiro relato da detecção de CTX-M, de um isolado clínico de *E. coli* (BAUERNFEIND; GRIMM; SCHWEIGHART, 1990). Desde seu descobrimento, essas enzimas estão se disseminando mundialmente, sendo

encontradas em diferentes gêneros de enterobactérias (BONNET, 2004; ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008; ROCCHETTI, 2010). Hoje, encontram-se descritos na literatura 172 tipos de CTX-M, segundo Lahey Health (2017).

1.10.4 Carbapenemases

Existem diversos tipos de carbapenemases, atualmente essas enzimas foram incluídas nas classes A, B ou D, onde algumas são codificadas por genes cromossômicos e outras por genes plasmidiais (QUEENAN; BUSH, 2007; BUSH; FISHER, 2011; FARIA JUNIOR, 2014). Nos últimos anos, as carbapenemases do tipo KPC (do inglês, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases), NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*), VIM (*VEROna integron–encoded metallo- β -lactamase*), OXA (*oxacillin-hydrolyzing*) e IMP (Imipenemase) estão em destaque no mundo devido sua presença em infecções hospitalares (WALSH, 2005; QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; FARIA JUNIOR, 2014).

1.10.5 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)

As enzimas do tipo KPC (sigla para “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”), foram incluídas na classe A (AMBLER, 1980) ou grupo 2f de Bush (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995), e são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). As KPC-1 foram descritas pela primeira vez no ano de 2001, na Carolina do Norte no EUA, de uma cepa de *K. pneumoniae* isolada em 1996, durante uma pesquisa de vigilância designada de ICARE (“*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*”). No momento, temos 24 variantes de KPC (LAHEY HEALTH, 2017). O gene responsável por codificar a enzima KPC está comumente localizado no plasmídeo, com grande capacidade de disseminação. Somada a isso, temos também, o fato deste gene ser, frequentemente, encontrado em cepas da família *Enterobacteriaceae* que possui a

capacidade de acumular e transferir determinados tipos de resistência (QUEENAN; BUSH, 2007; VIEGAS; SOARES, 2018).

1.10.6 New Dehli Metallo- β -lactamase

Em 2008 foi descrita na Índia a enzima New Delhi metallo- β -lactamase tipo 1 (NDM-1), isolada de *K. pneumoniae*. É uma β -lactamase nova do tipo carbapenemase identificada como classe B que possui seus genes associados a elementos genéticos móveis (YONG *et al.*, 2009; FARIA JUNIOR, 2014). Esta enzima é capaz de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenens, com exceção do aztreonam (WALSH, 2005; FARIA JUNIOR, 2014). As carbapenemases do tipo NDM-1 passaram a ser detectadas em muitas espécies, com predomínio em *K. pneumoniae* e *E. coli* (KUMARASAMY *et al.*, 2010; POIREL *et al.*, 2010; FARIA JUNIOR, 2014).

1.10.7 Verona Imipenemase (VIM)

Em 1999, a segunda subclasse descrita de MBL adquirida foi denominada VIM foi observada em uma cepa de *P. aeruginosa* originária de VERONA, Itália (LAURETTI *et al.*, 1999; FARIA JUNIOR, 2014). Muitas variantes de VIM já foram descritas, tanto em microrganismos fermentadores da glicose, quanto em não fermentadores. Embora a maioria das descrições tenha ocorrido na Europa, algumas 25 variantes já foram identificadas na América e Ásia (WALSH, 2005; QUEENAN; BUSH, 2007; FARIA JUNIOR, 2014).

1.10.8 Imipenemase (IMP)

A primeira detecção da enzima imipenemase (IMP) ocorreu em 1994 (OSANO *et al.*, 1994), sendo designada como uma subclasse denominada IMP-1. Sendo encontrada em uma cepa de *Serratia marcescens* isolada no Japão, esta bactéria

apresentava resistência a imipenem e cefalosporinas de amplo espectro. Diversas variantes dessa enzima foram então descritas em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e enterobactérias de praticamente todos os continentes (WALSH, 2005; WALSH *et al.*, 2011; FARIA JUNIOR, 2014).

Na cidade de São Paulo em 2003, foi descrita pela primeira vez a presença de IMP em enterobactérias no Brasil em cepa de *K. pneumoniae* (LINCOPAN *et al.*, 2005). A partir de então, alguns outros casos em enterobactérias portadoras do gene *bla_{IMP}* foram informados (PENTEADO *et al.*, 2009; FARIA JUNIOR, 2014). Atualmente existem 53 variantes de IMP, segundo Lahey Health (2017).

1.10.9 Carbapenemase hidrolizante de oxacilina

Na Turquia no ano de 2003, a carbapenemase do tipo OXA-48 foi identificada em cepas de enterobactérias (POIREL *et al.*, 2004; FARIA JUNIOR, 2014). Bactérias produtoras destas enzimas foram isoladas em muitos países da Europa e Ásia (NORDMANN *et al.*, 2011; FARIA JUNIOR, 2014). Esta enzima é capaz de hidrolisar fracamente tanto os carbapenens como as cefalosporinas, sendo, portanto, uma das carbapenemases mais difíceis de serem identificadas fenotipicamente (NORDMANN *et al.*, 2011; FARIA JUNIOR, 2014). No Brasil, o primeiro relato aconteceu em 2014, na cidade de Porto Alegre onde cepas produtoras de OXA-48 foram isoladas de *Klebsiella* spp., *E. cloacae* e *C. freundii* (PINTO *et al.*, 2014; FARIA JUNIOR, 2014).

Diferentes fatores de virulência, incluindo aderência, invasão, e a habilidade de formação de biofilme são de suma importância para o desenvolvimento das ITUs, assim como o uso indiscriminado dos antimicrobianos usados no tratamento dessas infecções, o que nos permite compreender a relevância dessas informações para traçarmos medidas adequadas de tratamento e prevenção dessas infecções.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar as características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Escherichia coli* isoladas a partir de amostras de urina de onze pacientes que foram detectados com infecção do trato urinário (ITU), com idades entre 59 a 83 anos, durante o tratamento ambulatorial no Departamento Nefrologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto no Rio de Janeiro, durante os períodos de janeiro até março de 2014.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com infecção do trato urinário (ITU);
- Detectar a presença dos genes de virulência associados à *E. coli* uropatogênica (UPEC);
- Identificar a presença dos genes codificadores de resistência aos antimicrobianos em UPEC como: blaNDM-1, blaVIM-1, blaIMP-1, blaKPC (gene que codifica a produção de enzimas metalobetalactamase); blaCTX (gene que codifica a produção de enzimas betalactamase de espectro ampliado - ESBL) e o gene oxa-48 (gene que codifica a produção de OXA-carbapenemase);
- Avaliar ultra-estruturalmente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a capacidade de aderência e invasão em células VERO de linhagem contínua;
- Correlacionar a diversidade gênica das cepas de UPEC com fatores de virulência e resistência, grupos filogenéticos, aderência e invasão;

- Avaliar a capacidade de produção de biofilme em superfície abiótica de poliestireno por método semi-quantitativo.

3 MATERIAS E MÉTODOS

Este foi um estudo retrospectivo, dedicado à análise de cepas de *Escherichia coli* isoladas a partir de amostras de urina pacientes com infecção do trato urinário (ITU), com a faixa etária de 59 a 83 anos, durante o tratamento ambulatorial no Departamento Nefrologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto no Rio de Janeiro. Sendo registrado sob o número do Comitê de Ética: CAAE: 45780215.8.0000.5259.

3.1 Cepas

As cepas de *Escherichia coli* fazem parte da bacterioteca do Laboratório 1 do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ. Estas cepas foram isoladas a partir de amostras urinárias de pacientes provenientes do Ambulatório de Neurologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto no Rio de Janeiro, durante o período de janeiro até março de 2014.

Após a identificação da espécie bacteriana (EDWARDS; EWING, 1962), as cepas foram estocadas em meio GC com glicerol 20% (v/v) e mantidas em temperatura de -20°C e -70°C.

As cepas foram reisoladas e confirmadas pela identificação morfotintorial através da coloração de Gram e subsequente identificação por meio de testes bioquímicos manuais e automatizados. Manualmente, foram utilizados ensaios em tubos contendo os meios fabricados pela Merck® de: ágar ureia (produção de urease); ágar SIM (produção de H₂S e indol e avaliação da motilidade); ágar LIA (descarboxilação da lisina); ágar TSI (uso dos carboidratos glicose, sacarose e lactose, e produção de H₂S) e ágar citrato de Simmons (utilizando a fonte de carbono para crescimento). E também confirmado por identificação automatizada usando o sistema Vitek® e *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF) que usa aplicação da espectrometria de massa.

As cepas isoladas seguiram os seguintes critérios de inclusão: cepas isoladas de urina de janeiro a março de 2014; de pacientes com infecção por *E. coli*; infecção de repetição por *E. coli*; cepas isoladas de pacientes do ambulatório de nefrologia com

mais de 55 anos de idade. Os critérios de exclusão das cepas isoladas foram: infecção por outras bactérias que não *E. coli*; cepas isoladas de pacientes de outros ambulatorios; cepas isoladas de pacientes com menos de 55 anos de idade.

3.2 Confirmação da identificação das cepas de *E. coli* por MALDI-TOF

O preparo das lâminas com 48 poços, foi dividido em três grupos de 16 poços e separado 1 poço de calibração central conforme orientações do fabricante, com a cepa *E. coli* ATCC 8739. Foi realizada com o auxílio da Estação de Preparação VITEK® MS para conectar as informações das cepas com o VITEK® MS. Foi inoculado 1µL de colônia bacteriana num poço da lâmina e adicionado mais 1µL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico que é a matriz, após esta aplicação foi deixado secar à temperatura ambiente. Após a secagem a lâmina foi carregada no VITEK® MS para a realização da leitura através de um conjunto de software da Estação de Preparação VITEK® MS (LAY JR, 2000; ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011; GOULART; RESENDE, 2013; CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012; BIOMÉRIEUX, 2018)

3.3 Determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e sensibilidade a fosfomicina

Seguimos a metodologia do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2014, e recentemente comparado com o CLSI de 2017 (CLSI, 2014; 2017), utilizamos a Concentração Inibitória Mínima (CIM) no equipamento *MicroScan Walkay Away 96SI*, utilizando o painel de Gram negativo de urina com fosfomicina, com os antimicrobianos mostrados no Quadro 1. Como controles, foram utilizadas as cepas padrão *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218.

Quadro 1 - Classe dos antimicrobianos testados nas cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia

Classes dos Antimicrobianos		
Aminoglicosídeos	Amicacina Gentamicina Tobramicina	
β-lactâmicos	Penicilinas	Ampicilina Ampicilina/Sulbactam Amoxicilina/Clavulanato Piperacilina/Tazobactam
	Monobactâmico	Aztreonam
	Carbapenêmicos	Imipenem Meropenem Ertapenem
	Cefalosporinas	Cefepime Cefotaxima Ceftazidima Cefuroxima Cefalotina
Fosforados	Fosfomicina	
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Norfloxacina Levofloxacina	
Glicilciclina	Tigeciclina	
Nitrofurono	Nitrofurantoína	
Sulfonamida	Sulfametoxazol/Trimetoprim	

Fonte: A autora, 2018.

3.4 Reação em cadeia da polimerase para genes de virulência, genes de resistência antimicrobiana e agrupamento filogenético de UPEC

As cepas de *E. coli* foram cultivadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C por 24 horas. Após este procedimento, foram repicadas em ágar TSA (ágar tripticase de soja) a 37°C por 24h. Após esse período, três colônias das cepas de UPEC foram resuspendidas em 100µL de água deionizada estéril. A suspensão bacteriana obtida foi fervida por 10 minutos e centrifugada. Os sobrenadantes assim obtidos foram utilizados para a reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação em

cadeia da polimerase em multiplex foi realizada utilizando iniciadores específicos para os genes de virulência e resistência. As sequências dos iniciadores, temperatura de anelamento e peso molecular dos produtos para detecção dos genes de virulência, foram investigados conforme escrito por Yamamoto *et al.* (1995).

Os fatores de virulência usados foram: o gene *pap* que codifica o *pilus*, que está associado à pielonefrite. O operon *pap* codifica a fímbria P e este operon pode estar presente em um ou mais elementos genéticos móveis conhecidos como ilhas de patogenicidade (RASKO *et al.*, 2001); o gene *sfa* que possui operons codificadores de adesina que codifica as fímbrias S e fímbrias F1C, gene *afa* associado também a formação de fímbria S; o gene *hly* (que codifica a produção de α - hemolisina); o gene *aer* (aerobactina) que está relacionado com o metabolismo do ferro pelas bactérias, e a Ilha de Patogenicidade (gene *PAI*). Todos estes genes foram pesquisados pela técnica de PCR, os mesmos descritos nas referências Yamamoto *et al.* (1995) e Johnson e Stell (2000), como mostra a Quadro 2. A tipagem filogenética para gene de virulência foi realizada por PCR multiplex (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; GIRARDINI *et al.*, 2012).

Quadro 2 - Genes, sequências iniciadoras e tamanho dos fragmentos amplificados no PCR realizado com as cepas de *E. coli* isoladas de ITUs

Genes Virulência	Codifica	Sequência (5'---- 3')	PB	Referências
<i>pap3</i> <i>pap4</i>	Fímbria P	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>sfa1</i> <i>sfa2</i>	Fímbria S	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTATTACAACCTGGCA	410	
<i>hly1</i> <i>hly2</i>	Hemolisina	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCAATCCCGTCA	1177	
<i>aer 1</i> <i>aer 2</i>	Aerobactina	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	602	
<i>PAI F</i> <i>PAI R</i>	Ilhas de Patogenicidade	GGACATCCTGGTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAAGCCGAAC	930	

Fonte: Adaptado de Yamamoto *et al.*, 1995 e Johnson e Stell, 2000.

Para evidenciar a presença de resistência, foram pesquisados os seguintes genes: *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{KPC} (gene que codifica a produção de enzimas metalobetalactamase); *bla*_{CTX} (gene que codifica a produção de enzimas

betalactamase de espectro ampliado - ESBL) e o gene *oxa-48* (gene que codifica a produção de OXA-carbapenemase); foram investigados segundo Mulvey *et al.* (2003); Carmo *et al.* (2012) e Doyle *et al.* (2012).

Para identificação de grupos filogenéticos foram investigados os genes *chuA*, *yja*, *tspE* (grupos filogenéticos), segundo Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5%-2%, e posteriormente identificados após visualização em transiluminador. Onde utilizamos o marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Invitrogen).

3.5 Ensaios de aderência com *E. coli* utilizando linhagem celular VERO

Primeiramente as células VERO foram cultivadas em frascos contendo meio MEM (Meio mínimo essencial, Difco-BRL®) acrescido de 2% de SFB, gentamicina 50 µg / mL e fungizona 2,5 g / mL. Eles são mantidos em um forno a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Cada poço da microplaca foi lavado duas vezes com PBS e D-MEM com 2% de SFB, depois inoculados 35 µL de cultura bacteriana (cultivados durante 18 horas a 37°C) nas microplacas. As microplacas foram incubadas por um período de 3 horas a 37°C e, em seguida, as culturas de células foram lavadas, fixadas e coradas com Giemsa (1:20). Lavamos e montamos as lâminas para visualização em microscópio de luz (ROSA *et al.*, 1998). Os controles utilizados foram: *E. coli* DH5α como controle negativo; e o EAEC 042 e UPEC I64 como controle positivo para este teste. E os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Teste de Tukey) considerando o intervalo de confiança de 95% (p<0,05) para significância, com uso do Programa GRAPHPAD PRISM™.

3.6 Ensaios de invasão com *E. coli* usando linha de células VERO

A partir dos preceitos de Pereira *et al.* (2008), realizamos o ensaio de invasão quantitativa. As monocamadas de células VERO foram cultivadas diretamente em garrafas de plástico, após crescimento foram passadas para placas de cultura de

tecidos de 24 poços contendo meio de manutenção de MEM 2% SFB, e mantidos em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, até atingir um tapete semi-confluyente. As cepas bacterianas de *E. coli*, foram inoculadas em TSB durante a noite a 37°C. As concentrações bacterianas foram determinadas por densitometria óptica. As alíquotas de suspensões bacterianas (aproximadamente 10⁸ UFC/mL-1) foram adicionadas a monocamadas de VERO em poços contendo 1 mL de meio de uso de MEM sem antimicrobiano. As monocamadas infectadas foram incubadas durante 3 horas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂. Após 3 h as monocamadas de células foram lavadas com PBS-D e suplementadas com MEM e 100 µg/mL de amicacina (antimicrobiano) logo após foram adicionadas a metade dos poços e incubadas por 1h a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS-D e lisadas com 1mL de Triton a 1% (BioRad), durante 30 min. Alíquotas do lisado de células foram diluídas em PBS-D e plaqueadas em TSA e incubadas a 37°C por 18-24h, para quantificar as unidades formadoras de colônia (UFC) das bactérias intracelulares viáveis. A capacidade invasiva das cepas de *E. coli* foi comparada com controles positivos e negativos, respectivamente, *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (C20) e *E. coli* DH5α não invasiva (ROSA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2015). O índice de invasão foi expresso como a porcentagem de bactérias intracelulares dividida pelo número de bactérias inoculadas (10⁸), segundo Tang *et al.* (1993). Todas as cepas foram sensíveis à amicacina. Este experimento foi realizado em triplicada.

3.7 Ensaio de formação de biofilme semi-quantitativo

A avaliação de formação de biofilme semi-quantitativa, foi realizada em placas de MGM de poliestireno com 96 poços, onde adicionamos 200 µl de DMEM contendo 0,45% de glicose, estes foram inoculados com 5µL (aproximadamente 10⁵ UFC) de uma cultura bacteriana em meio líquido LB (Luria-Bertani) cultivada previamente por 18 horas até atingir a fase estacionária 37°C. Então, a placa foi incubada por 18 horas a 37°C. Em seguida, as células planctônicas foram removidas, por enxague por três vezes com salina e o substrato foi corado com 0,5% de Cristal Violeta por 5 min. Após lavagem com salina e secagem com papel absorvente, a formação de biofilme foi

quantificada por espectrofotometria, adicionando 200 µl de etanol a 95% a cada poço e, após a solubilização por 30 min em temperatura ambiente, 150 µl foram transferidos para uma nova placa de microtitulação, e a absorbância foi determinada em leitor de placas de ensaio imunoenzimático a 570 nm (MOHAMED *et al.*, 2007).

Todas as cepas de *E. coli* que foram testadas em comparação com as cepas de controle 042 e I64 foram classificadas como não formadoras de biofilme aquela com Densidade Ótica (OD) <0,500; formador fraco de biofilme no intervalo entre 0,500 \geq OD \leq 1,000, e biofilme forte OD > 1,001.

3.8 Análise da Diversidade Genômica Bacteriana

Para se determinar o grupo filogenético seguimos recomendações de buscamos inclui as bactérias do trabalho nos grupos correspondentes: No Grupo A compreendendo os isolados com *chuA*-/*TSPE4.C2*; já o grupo B1 compreende os isolados com *chuA*-/*TSPE4.C2* +. No grupo B2 incluímos os isolados com *chuA* +/*yjaA* +; e o grupo D os isolados com *chuA* +/*yjaA*-.

O PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) é uma técnica usada para avaliação da diversidade genética de cepas bacterianas epidemiologicamente relacionadas que contenham um precursor comum (BORGES *et al.*, 2012; MUNKHDELGER *et al.*, 2017).

A técnica de PFGE é uma ferramenta “padrão ouro” para diferenciação clonal de diversos patógenos bacterianos (PERSING, 2004). Possui um elevado poder de diferenciação (OLIVE; BEAN, 1999), tendo uma grande importância epidemiológica na distinção de linhagens patogênicas e no monitoramento de sua propagação na população. É um método tem se salientado como muito eficiente para identificar clones de *E. coli* (LEOMIL *et al.*, 2005).

O procedimento de PFGE consiste na separação de fragmentos de DNA de alto peso molecular, obtidos após a digestão do DNA cromossomal da bactéria por enzimas de restrição, esta enzima de restrição XbaI, é a de eleição para a diferenciação de *E. coli*. O perfil de restrição gerado é utilizado para comparação clonal das cepas (PERSING, 2004). A separação destes fragmentos se faz, utilizando uma corrente de eletroforese especial, onde a direção e intensidade dos pulsos

elétricos são aplicados de forma alternada, em intervalos de tempo diferentes. A alternância constante do campo elétrico força as moléculas a modificarem sua orientação ao se moverem, e, quanto mais longa for à molécula, maior o tempo que necessita para que encontre uma orientação que favoreça o movimento ao longo do gel (ALVES, 2003). Por apresentar diferentes metodologias para a técnica de PFGE foi criado o protocolo “*PulseNet*” para tornar a técnica mais universal possível, sem variações, este protocolo segue com a colaboração de diferentes laboratórios do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (RIBOT *et al.*, 2006).

A técnica de Eletroforese de Campo Pulsado (PGFE) foi realizada segundo as recomendações de Teixeira *et al.* (1997). A avaliação da presença de clones predominantes foi realizada por construção de matrizes de similaridades e dendrogramas para a evidenciação da inter-relação entre as cepas estudadas. O percentual de similaridade entre as cepas foi obtido pelo emprego do coeficiente de Dice (1945).

3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nosso estudo utilizou a MEV para registrar o momento em que as cepas de *E. coli*, aderiam e invadiam as células VERO, por isso não foi realizado em todas as cepas desta pesquisa.

Metodologia utilizada em ensaios de aderência para incubar a placa por um período de 3 horas a 37°C, quando fixada e corada com solução fixadora composta por glutaraldeído a 2,5%; 4% de formaldeído preparado a fresco em tampão de cacodilato 0,1M, com de pH 7,2. As cepas foram fixadas durante 1h à temperatura ambiente e 12h a 4°C. As cepas foram então subsequentemente lavadas em tampão cacodilato 0,1M; e pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) e 0,8% de ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]); lavado em tampão cacodilato 0,1M; desidratado em uma série de etanol graduada (20–100° GL) por 1 hora a cada etapa; ponto crítico seco em CO₂; montado em tocos metálicos e revestido com ouro (20–25 nm depositados). As cepas foram examinadas nos microscópios eletrônicos de varredura Jeol JSM-5310 e FEI Quanta 250, ambos operando a 25–30 kV e uma pressão de $2^{-8} \times 10^{-4}$ Pa (TORRES; SOUZA; MIRANDA, 2013).

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação da identificação das cepas de *E. coli* por MALDI-TOF

A utilização de MALDI-TOF na identificação das cepas usadas neste estudo foi realizada com aproveitamento de 100%. Todas as cepas foram identificadas como *E. coli*. O equipamento identifica como o gênero e espécie a partir da proximidade de nível de confiança de 100% de similaridade, conforme Tabela 1. Mostrando o nível de confiança de cada cepa para similaridade de acordo com os critérios propostos pelo fabricante, para um resultado ser considerado válido a nível de identificação de espécie, o valor do escore deve ser $\geq 2,0$ para *E. coli* e as Figura 3 e 4, são as figuras obtidas através de software de do equipamento VITEK® MS.

Além das 11 cepas, usadas neste teste, foram adicionadas 4 cepas padrões de *E. coli* confirmadas por essa metodologia, sendo elas: EAEC 042, EHEC EDL 931, EPEC 2348/69 e a UPEC I64. Onde todas foram identificadas corretamente.

Tabela 1 - Percentual de nível de confiança na identificação das cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU, utilizando o MALDI-TOF (n=15)

Nível de Confiança (%)	Total de Cepas
98,9	1
99	1
99,3	1
99,8	2
99,9	10
Total	15

Fonte: A autora, 2018.

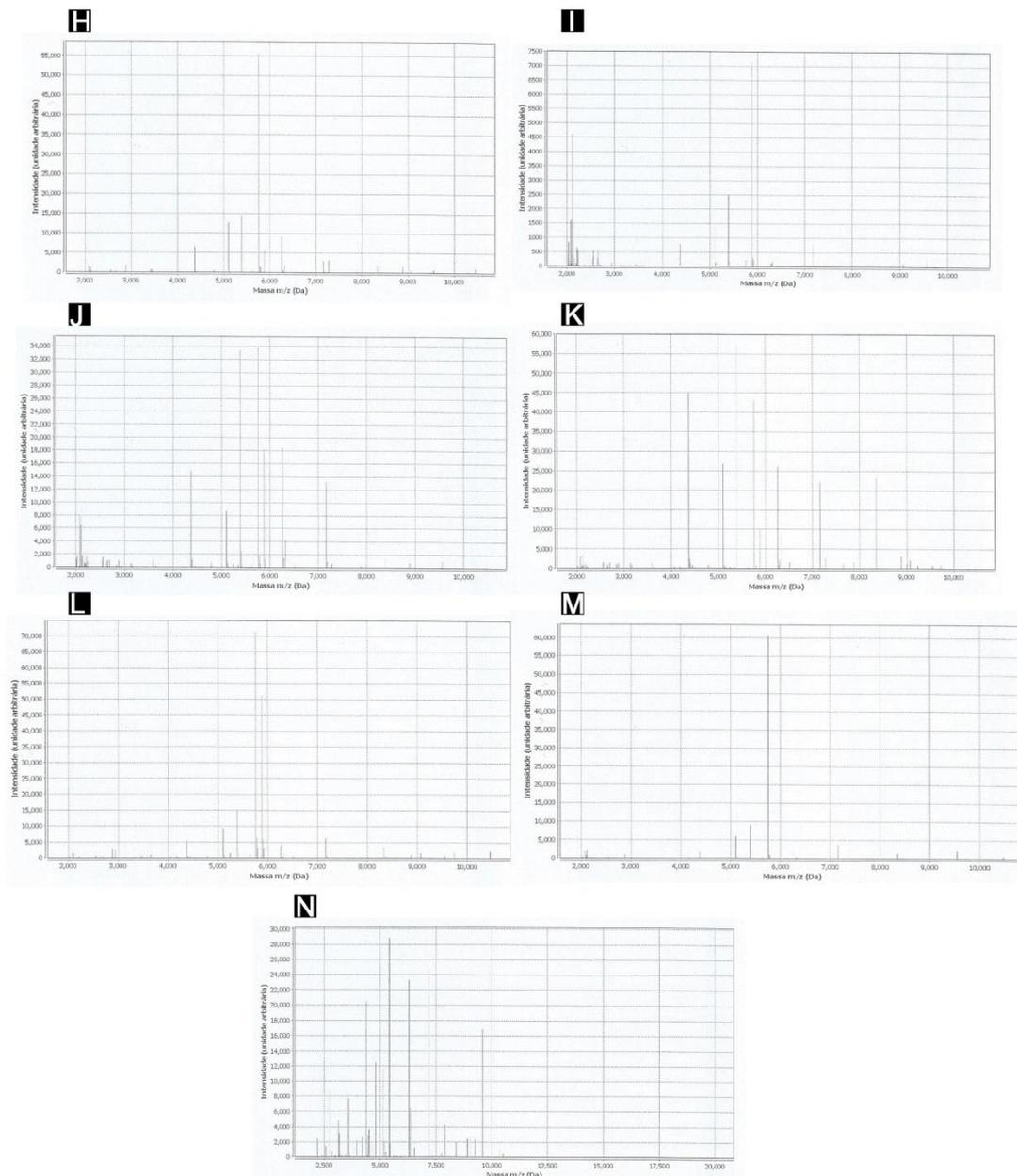
Figura 3 - Resultados das análises realizadas pelo método de MALDI-TOF, para identificação das cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (Continua)



Legenda: A – Cepa padrão UPEC I64; B – EAEC 042; C – Cepa 1; D – Cepa 2; E – Cepa 3; F – Cepa 4 e G-Cepa 5.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 4 - Resultados das análises realizadas pelo método de MALDI-TOF, para identificação das cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (Conclusão)



Legenda: H – Cepa 6; I – Cepa 7; J – Cepa 8; K – Cepa 9; L – Cepa 10; M – Cepa 11 e N - Cepa EHEC EDL 931.

Fonte: A autora, 2018.

4.2 Determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e sensibilidade a fosfomicina

O TSA foi realizado de forma automatizada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) no equipamento MicroScan WalkayAway96SI. Onde obtivemos os seguintes resultados para resistência aos β -lactâmicos, que se encontram no quadro 3.

Quadro 3 - Resultado do perfil encontrado para os antimicrobianos β -lactâmicos testados nas cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=11)

Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ampicilina/Sulbactam	S	R	R	I	R	R	S	R	S	R	R
Ampicilina	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R
Aztreonam	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
Cefepima	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Ceftazidima	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Cefuroxima	S	S	I	S	R	R	R	I	I	S	S
Cefalotina	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ertapenem	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
Meropenem	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
Piperacilana/Tazobactam	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S

Legenda: S – sensível; I – intermediário; R – resistente.

Fonte: A autora, 2018; segundo os critérios estabelecidos no CLSI, 2014.

No quadro 4 podemos observar os resultados de resistência aos β -lactâmicos testados nas cepas isoladas.

Quadro 4 – Resultado do perfil de resistência aos β -lactâmicos testados (n=11) (Continua)

Cepas	Resistências Encontradas em β lactâmicos
1	Não apresentou resistência nos β -lactâmicos
2	AMP/SUL; AMP; CFL
3	AMP/SUL; AMP; CFL
4	AMP; CFL
5	AMP/SUL; AMP; ATM; CEP; CTX; CAZ; CFX; CFL; ERT; PIP/TAZ

Quadro 4 – Resultado do perfil de resistência aos beta- lactâmicos testados (n=11)
(Conclusão)

Cepas	Resistências Encontradas em betalactâmicos
6	AMP/SUL; AMP; CFX; CFL
7	CFX; CFL
8	AMP/SUL; AMP; CFL
9	CFL
10	AMP/SUL; AMP; CFL
11	AMP/SUL; AMP; ATM; CFL

Legenda: AMP/SUL – Ampicilina/Sulbactam; AMP – Ampicilina; ATM – Aztreonam; CFL – Cefalotina; CEP – Cefepima; CTX – Cefotaxiama; CAZ – Ceftazidima; CFX – Cefuroxima; CFL – Cefalotina; ERT - Ertapenem; MER – Meropenem; IMI – Imipenem; PIP/TAZ – Piperacilina/Tazobactam.

Fonte: A autora, 2018.

O Quadro 5 nos permite observar a associação dos perfis de resistência e as cepas analisadas.

Quadro 5 - Associação de resistência entre as cepas de *E. coli* frente a classe dos betalactâmicos (n=11)

Cepas	Resistência betalactâmicos
2; 3; 8; 10	AMP/SUL; AMP; CFL
4	AMP; CFL
5	AMP/SUL; AMP; ATM; CEP; CTX; CAZ; CFX; CFL; ERT; PIP/TAZ
6	AMP/SUL; AMP; CFX; CFL
7	CFX; CFL
9	CFL
11	AMP/SUL; AMP; ATM; CFL

Legenda: AMP/SUL – Ampicilina/Sulbactam; AMP – Ampicilina; ATM – Aztreonam; CFL – Cefalotina; CEP – Cefepima; CTX – Cefotaxiama; CAZ – Ceftazidima; CFX – Cefuroxima; CFL – Cefalotina; ERT - Ertapenem; MER – Meropenem; IMI – Imipenem; PIP/TAZ – Piperacilina/Tazobactam.

Fonte: A autora, 2018; segundo os critérios estabelecidos no CLSI, 2014.

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos, fosforados, fluoquinolonas, glicilciclina, nitrofurano e sulfonamidas, podem ser analisados no Quadro 6.

Quadro 6 - Resultado do perfil de resistência dos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos; fosforados; fluoquinolonas; glicilciclina; nitrofurano e sulfonamida, encontrados nas cepas de E. coli isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=11)

Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R
Fosfomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Levofloxacina	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R
Nitrofurantoina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Norfloxacina	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R
Tobramicina	S	S	R	S	S	S	S	R	S	I	S
Trimetoprima/Sulfametoxazol	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
Tigeciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: S – sensível; I – intermediário; R – resistente.

Fonte: A autora, 2018.

O quadro 7 apresenta as associações de resistência aos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos; fosforados; fluoquinolonas; glicilciclina; nitrofurano e sulfonamidas.

Quadro 7 - Associações de resistência aos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos; fosforados; fluoquinolonas; glicilciclina; nitrofurano e sulfonamidas (n=11)

Cepas	Resistências Encontradas
1	Não apresentou resistência aos antimicrobianos
2	Sulfonamidas
3	Fluoroquinolonas; Tobramicina; Sulfonamidas
4	Fluoroquinolonas; Sulfonamidas
5	Sulfonamidas
6	Sulfonamidas
7	Fluoroquinolonas; Sulfonamidas
8	Fluoroquinolonas; Tobramicina; Sulfonamidas
9	Fluoroquinolonas
10	Fluoroquinolonas; Gentamicina; Sulfonamidas
11	Fluoroquinolonas; Sulfonamidas

Fonte: A autora, 2018.

O Quadro 8 mostra a similaridade de resistência entre as cepas de *E. coli* de acordo com as classes de antimicrobianos: aminoglicosídeos; fosforados; fluoroquinolonas; glicilciclina; nitrofurano e sulfonamida.

Quadro 8 - Similaridade entre as resistências das cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=11)

Cepas	Resistência a aminoglicosídeos; fosforados; fluoroquinolonas; glicilciclina; nitrofurano e sulfonamida
2; 5; 6	Sulfonamidas
3; 8	Fluoroquinolona; Tobramicina; Sulfonamidas
4; 7; 11	Fluoroquinolona; Sulfonamidas
9	Fluoroquinolona
10	Fluoroquinolona; Gentamicina; Sulfonamidas

Fonte: A autora, 2018.

4.3 Reação em cadeia da polimerase para genes de resistência, genes de virulência aos antimicrobianos e agrupamento filogenético de UPEC

4.3.1 Genes de resistência

Após leitura das CIM foi observado que todas as cepas apresentaram resistência ou foram intermediárias para uma das classes de β -lactâmicos testados. Com base nesses resultados, partimos para a realização do PCR para genes de resistência, pesquisando os genes, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{CTX}* e *bla_{KPC-2}*. A cepa 5 apresentou o gene *bla_{KPC-2}*.

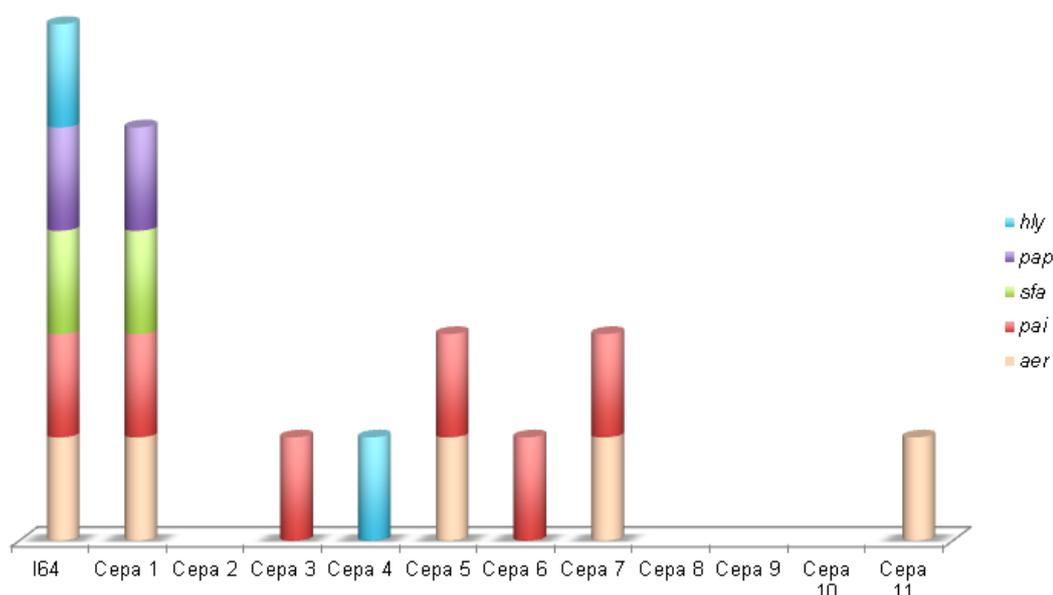
4.3.2 Genes de virulência

Em nosso estudo, os genes de virulência pesquisados estão relacionados à presença de fímbrias P (gene *pap*); a formação de adesinas (gene *afa* e *sfa*); presença de sideróforo da aerobactina na absorção de ferro (gene *aer*); detecção de alfa-

hemolisina (gene *hly*). Investigamos também, a presença de ilha patogenicidade usando o gene *PAI*, é possível encontrar nestas ilhas e genes cromossômicos capazes de codificar alguns fatores de virulência.

Conforme observado no Gráfico 1, detectamos que 36% das cepas (3, 4, 6 e 11) exibiram apenas um fator de virulência. Dezoito por cento das cepas (5 e 7) apresentaram dois fatores. Dez por cento das cepas (1) com quatro fatores. E 36% das cepas (2, 8, 9, 10) com ausência dos fatores de virulência estudados.

Gráfico 1 – Genes de virulência pesquisados em cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=12)



Legenda: *hly* – gene que codifica a produção de α - hemolisina; *pap* – gene que codifica a fímbria P; *sfa* - possui operons codificadores de adesina que codifica as fímbrias S e fímbrias F1C; *PAI* - Ilha de Patogenicidade; *aer* - gene relacionado com o metabolismo do ferro.

Fonte: A autora, 2018.

Tivemos cinco isolados positivos para os marcadores PAI, e destes, cinco, apenas três estão associados a alguns dos fatores de virulência investigados neste estudo.

4.3.3 Agrupamento filogenético

Dentro das cepas estudadas obtivemos 72,2% (n = 8) foram positivas para o gene *chuA* 63,6% (n = 7) foram positivas para o gene *TSPE4.C2*, enquanto 45,4% (n = 5) foram positivas para o gene *yjaA*.

Na Quadro 9 é possível observar a análise filogenética das cepas usadas neste estudo foram identificadas como grupo A 27,23% (n = 3), B1 9,1% (n = 1), B2 18,2% (n = 2) e D 45,47% (n = 5).

Quadro 9 - Percentual de grupo filogenético das 11 cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=11).

Grupo Filogenético	A	B1	B2	D
Cepas	3, 7, 8	1	2, 5	4, 6, 9, 10, 11

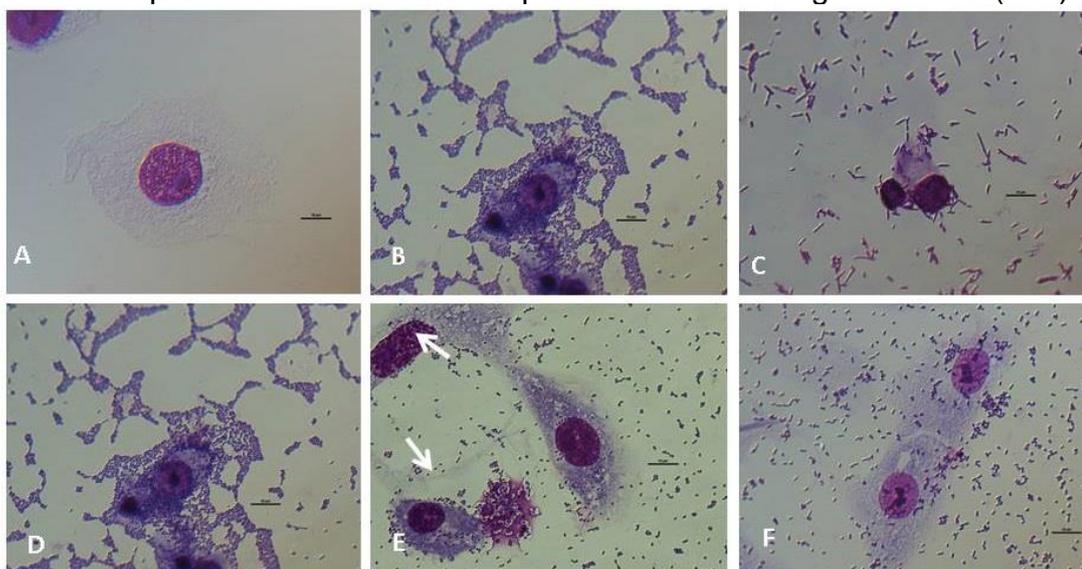
Fonte: A autora, 2018.

4.4 Ensaio de aderência com *E. coli* utilizando linhagem celular VERO

Apenas um dos isolados bacterianos (9,09% - 7) apresentou padrão de adesão agregativa (AA) na superfície das células VERO, enquanto as cinco cepas (45,45% - 1, 5, 6, 8 e 9) apresentaram aderência sem padrão típico do SPT, e cinco cepas não foram capazes de aderirem as células VERO (45,45% - 2, 3, 4, 10 e 11). A Figura 5 mostra de forma representativa as adesões agregativas e sem padrão típico, assim como os controles: células VERO sem *E. coli*, controle positivo para AA a cepa I64 e controle negativo cepa de *E. coli* DH5 α sem qualquer tipo de aderência, já no Gráfico 2, visualizamos a aderência estatística.

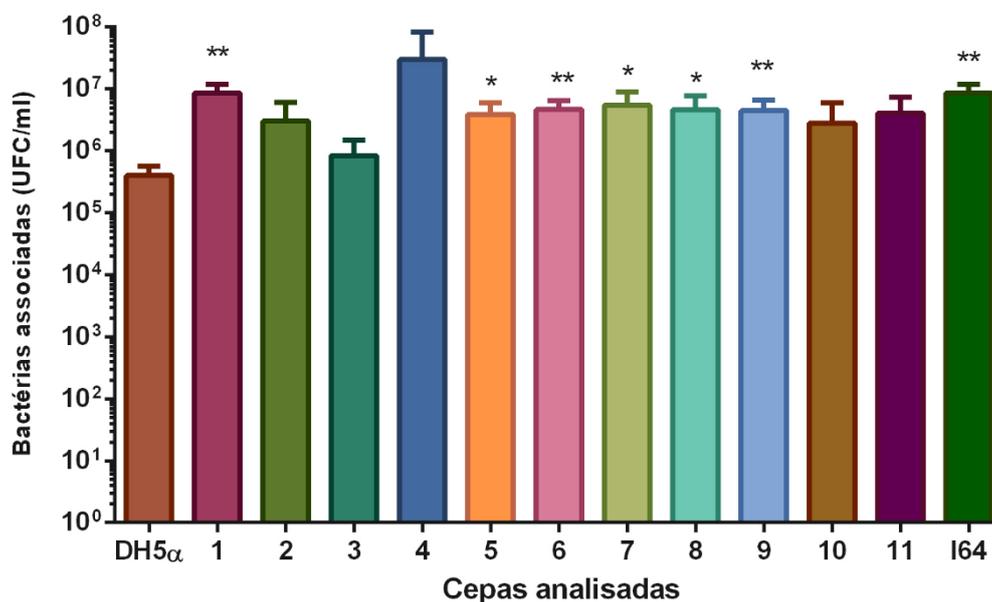
As cepas 1, 6, 7, 8 e 9 apresentaram os maiores valores de aderência as células VERO, não diferindo entre si. A cepa 5 apresentou menor capacidade de aderência ($p < 0,048$).

Figura 5 – Padrões de aderência observados em célula VERO inoculadas com as cepas de *E. coli* de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=5)



Legenda: AA – aderência agregativa; SPT – aderência sem padrão típico. A - células VERO sem *E. coli*; B - controle positivo para aderência I64; C- Controle negativo para aderência DH5α; D – cepa 1 com aderência SPT; E – cepa 7 com AA; F – cepa 11 com aderência SPT.
Fonte: A autora, 2018.

Gráfico 2 – Aderência apresentada em UPEC de pacientes da nefrologia com ITU



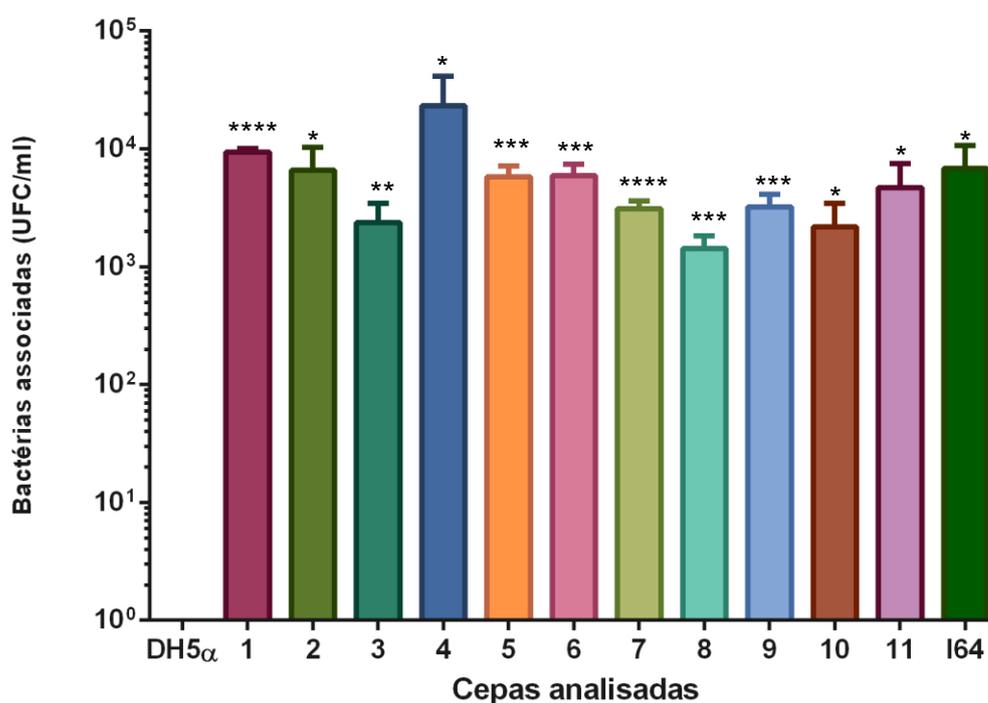
Legenda: DH5α – *E. coli* padrão não invasor; I64 – Padrão de UPEC invasora; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.
Fonte: A autora, 2018.

4.5 Ensaios de invasão com *E. coli* usando linha de células VERO

O resultado de invasão das cepas foi de 100%, ou seja, todas as cepas invadiram as células VERO com a mesma intensidade, conforme mostra

As cepas 1 e 7 apresentaram maior invasão, onde tivemos $P < 0,001$, quando comparada com os padrões negativos (DH5 α).

Gráfico 3 - Invasão apresentada em UPEC de pacientes da nefrologia com ITU



Legenda: DH5 α – *E. coli* padrão não invasor; I64 – Padrão de UPEC invasora; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$; **** - $P < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2018.

4.6 Ensaio de formação de biofilme semi-quantitativo

Para avaliarmos se a capacidade de formação de biofilmes está associada com a adesão, invasão ou a presença de genes de virulência específicos, foram testadas em superfície abiótica usando placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços.

Oito cepas foram classificadas como não formadoras de biofilmes comparando com as cepas 042 e I64. As cepas 4 e 10 foram classificadas como formadoras fracas

de biofilme. E a cepa 11 que foi considerada forte como formadora de biofilme, como mostra a Quadro 10.

Quadro 10 - Classificação do biofilme de acordo com a densidade ótica (DO) (n=11)

Densidade Ótica (DO)	Resultado do Biofilme	Cepas
DO<0,5	Não formadora	1; 2; 3; 5; 6; 7; 8; 9
0,5 ≥DO≤1,0	Fraco	4; 10
DO>1,001	Forte	11

Fonte: A autora, 2018.

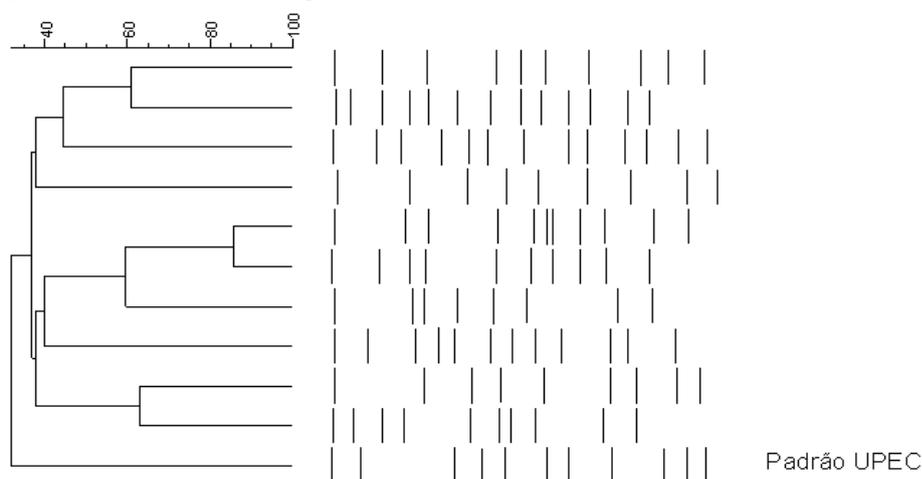
4.7 Análise da Diversidade Genômica Bacteriana

Com exceção da cepa 7, todas as cepas testadas apresentaram similaridade com a UPEC I64, utilizada como organismo de referência (cepa padrão).

As cepas 3 e 7 foram isoladas do mesmo paciente, em períodos diferentes e fazem parte do mesmo grupo. A cepa 7 foi isolada da segunda infecção, e esta apresentou ganho do gene *aer*.

A Figura 6 mostra o dendrograma gerado do PFGE das cepas de *E. coli*.

Figura 6 - Dendrograma do PFGE com as cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=10)



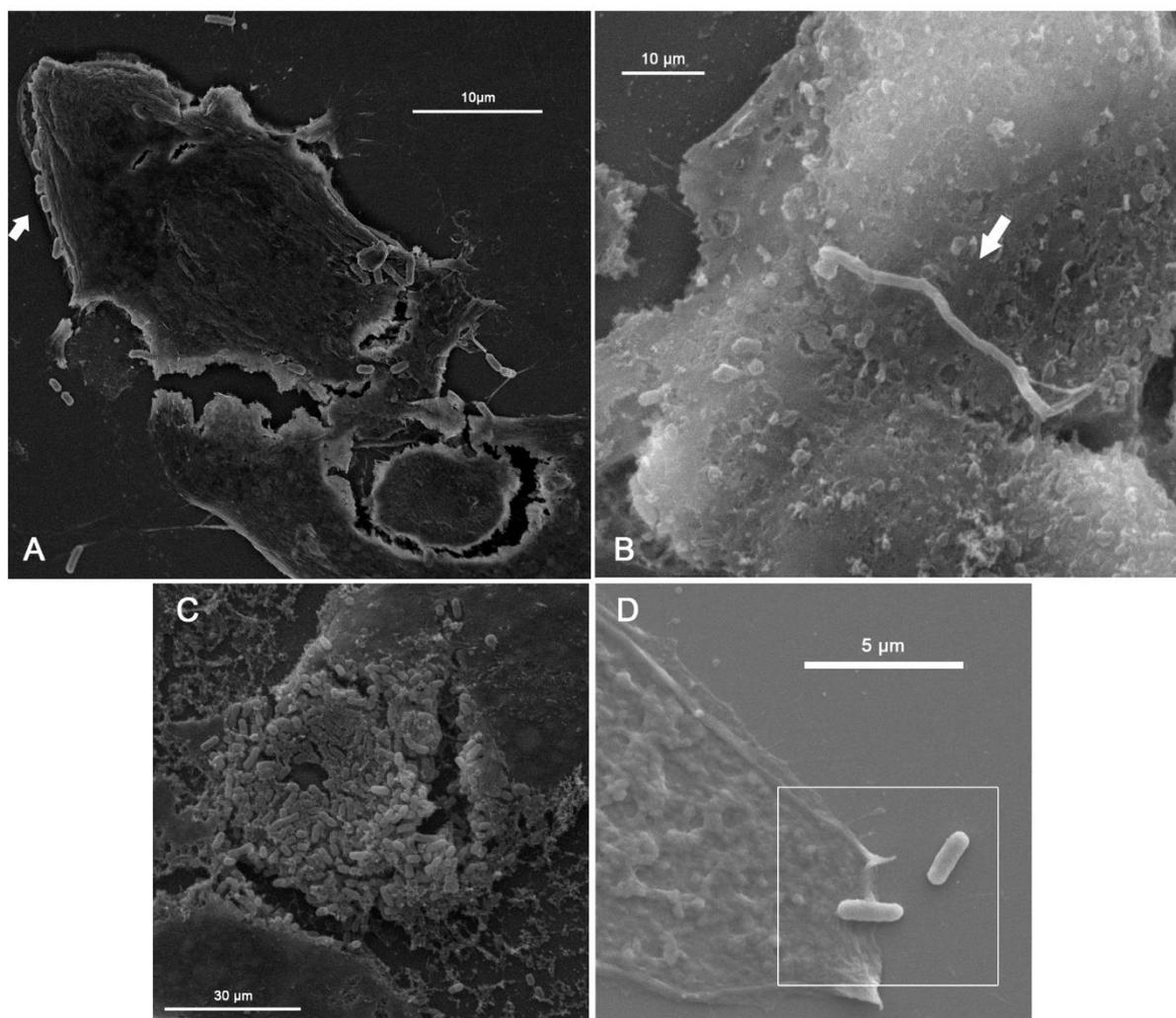
Legenda: A régua representa o percentual de similaridade obtida pela análise do coeficiente de Dice (1945).

Fonte: A autora, 2018.

4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Como nem todas as cepas foram aderentes, escolhemos as cepas 2 e 4 que apresentaram perfil não aderente e cepa 1 e 7 que apresentaram perfil aderente para a realização da MEV, como mostra a Figura 7.

Figura 7 - MEV mostrando a aderência em células VERO das cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=4)



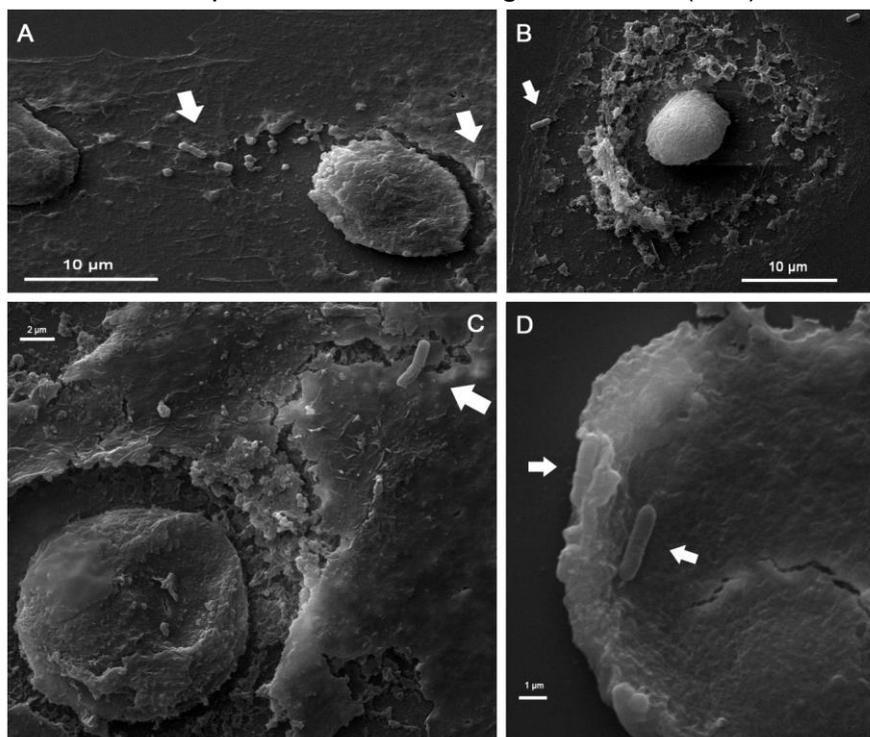
Legenda: A – cepa 1, a seta mostra as bactérias aderindo a superfície da célula VERO, após sua fratura; B - cepa 2, a seta mostra a bactéria na superfície da célula VERO com formação de filamentação; C - cepa 4, as bactérias em contato com a superfície da célula VERO; D - cepa 7, o quadrado destaca o momento final da etapa de adesão, quando se inicia a entrada da bactéria na célula VERO, após sua fratura.

Fonte: A autora, 2018.

Para analisarmos a invasão, foram utilizadas as mesmas cepas de aderência (1, 2, 4 e 7), a fim de observarmos correlação com aderência, tendo em vista que todas

as cepas utilizadas no estudo foram capazes de invadir as células VERO, conforme Figura 8.

Figura 8 - MEV mostrando a invasão em células VERO das cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes da nefrologia com ITU (n=4)



Legenda: A – cepa 1 no interior da célula VERO, após fratura; B - cepa 2; invadindo a célula VERO, após fratura; C- cepa 4, no interior da célula VERO, após fratura; D- cepa 7, a seta da esquerda, mostra as bactérias aderindo à superfície da célula VERO, após sua fratura, e a seta da direita mostra o interior da célula VERO com bactéria em seu interior após fratura.

Fonte: A autora, 2018.

4.9 Análise da correlação dos parâmetros estudados

Os resultados de sexo, idade, grupos filogenéticos, resistência aos antimicrobianos não β -lactâmicos e β -lactâmicos, genes de resistência e virulência, biofilme, aderência e invasão estão sumarizados no Quadro 11.

Quadro 11 - Correlação sexo, idade, grupos filogenéticos, resistência aos antimicrobianos não β -lactâmicos e β -lactâmicos, genes de resistência e virulência, biofilme, biofilme, aderência e invasão

Cepa	S/I	GF	Rn β	R β	GR	GV	BP	Aderência a CeIV (UFC/ml) ($\mu \pm \delta^2$) / Padrão	Invasão CeIV (UFC/ml) ($\mu \pm \delta^2$)
1*	F/66	B1	NA	NA	NA	<i>aer, pai, sfa, pap</i>	NF	8,633 \pm 3,251 x10 ⁶ / SPT	9425 \pm 601
2	F/66	B2	SULF	AMP/SUL; AMP; CFL	NA	NA	NF	3,025 \pm 3,021 x10 ⁶ / NA	6613 \pm 3709
3	M/64	A	FLU, TOB, SULF	AMP/SUL; AMP; CFL	NA	<i>pai</i>	NF	837500 \pm 652399 / NA	2373 \pm 1068
4	F/83	D	FLU, SULF	AMP; CFL	NA	<i>hly</i>	FrA	2,990 \pm 5,172 x10 ⁷ / NA	23253 \pm 18340
5*	F/68	B2	SULF	AMP/SUL; AMP; ATM; CEP; CTX; CAZ; CFX; CFL; ERT; PIP/TAZ	<i>blaKPC</i>	<i>aer, pai</i>	NF	3,875 \pm 2,040 x10 ⁶ / SPT	5798 \pm 1396
6	F/59	D	SULF	AMP/SUL; AMP; CFX; CFL	NA	<i>pai</i>	NF	4,656 \pm 1,766 x10 ⁶ / SPT	5926 \pm 1468
7*	M/64	A	FLU, SULF	CFX; CFL	NA	<i>aer, pai</i>	NF	5,475 \pm 3,571 x10 ⁶ / AA	31112 \pm 494,4
8	F/78	A	SULF, TOB	AMP/SUL; AMP; CFL	NA	NA	NF	4,600 \pm 3,109 x10 ⁶ / SPT	1435 \pm 381,1
9	F/80	D	FLU	CFL	NA	NA	NF	4,458 \pm 2,178 x10 ⁶ / SPT	3224 \pm 895,2
10	F/83	D	FLU, GEN, SULF	AMP/SUL; AMP; CFL	NA	NA	FrA	2,800 \pm 3,106 x10 ⁶ / NA	2191 \pm 1274
11*	F/66	D	FLU, SULF	AMP/SUL; AMP; ATM; CFL	NA	<i>aer</i>	FoR	4,075 \pm 3,377 x10 ⁶ / NA	4703 \pm 2768

Legenda: S – Sexo; I – Idade; GF – Grupamento Filogenético; Rn β – Resistência não β -lactâmico; ; R β – Resistência β -lactâmico; GR – Genes de Resistência; GV- Genes de Virulência; BP – Biofilme em poliestireno; CeIV – Células VERO; NA – Não apresentou; SULF – Sulfonamidas; FLU – Fluoroquinolona; TOB – Tobramicina; GEN – Gentamicina; AMP/SUL – Ampicilina/Sulbactam; AMP – Ampicilina; CFL – Cefalotina; ATM – Aztreonam; CEP – Cefepime; CTX – Cefotaxima; CAZ – Ceftazidima; CFX – Cefuroxima; ERT – Ertapenema; PIP/TAZ – Piperacilina/Tazobactam; NF – Não formadora; NF - OD < 0,5 ; FrA- Fraco 0,5 \geq OD \leq 1,0; FoR -Forte OD>1,001.

Fonte: A autora, 2018.

Ao correlacionarmos a idade com sexo com aderência, não houve relação desses critérios para formação de um padrão definido entre as cepas analisadas.

Ao analisarmos os grupos filogenéticos com a diversidade gênica, não notamos relação entre esses dois parâmetros de estudos. Tendo em vista que algumas cepas apresentaram grupos filogenéticos diferentes, e fatores de virulência iguais e são pertencentes do mesmo grupo filogenético e similares sem possuir proximidade.

Ao correlacionarmos o perfil filogenético com os fatores de virulência pesquisados, foi possível destacar que duas das cepas do filogrupo D não apresentaram nenhum dos fatores de virulência aqui investigados.

Ao compararmos a invasão com os grupos filogenéticos, não foi possível observar um porcentual de invasão respectivo para cada grupo filogenético.

Ao associarmos a invasão com os genes de virulência específicos deste estudo não foi possível correlacionar estes padrões, pois todas as bactérias invadiram tendo ou não algum dos fatores de virulência pesquisados.

Neste estudo não observamos relação entre os resultados de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos, testes de aderência e invasão, determinação dos genes para fatores de virulência e resistência, além de formação de biofilmes, pois as cepas co-irmãs próximas e similares apresentaram padrões distintos.

5 DISCUSSÃO

Das sete classes testadas, foi possível notar que para os antimicrobianos Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefalotina, Ciprofloxacino, Norfloxacino, Levofloxacino e Sulfametoxazol/Trimetoprima, as cepas apresentaram um maior percentual de resistência. Tendo em vista a frequente comercialização e uso da Ampicilina e Ampicilina/Sulbactam a nível ambulatorial em casos de infecções das vias respiratórias superiores a resistência é muito comum. A Cefalotina é utilizada na profilaxia de ITU's. Ciprofloxacina e Norfloxacina são as quinolonas mais prescritas para o tratamento das ITU's, seguidas atualmente do levofloxacino e Sulfametoxazol/Trimetoprimas. Adicionalmente, o uso de forma indiscriminada favorece o aumento de resistência a estes antimicrobianos.

Neste estudo foi verificada uma sensibilidade de 91% das cepas testadas a Imipenem. Corroborando com os resultados de Zhang *et al.* (2017), que observaram que 100% de suas cepas se apresentaram sensíveis a este antimicrobiano. Dentro dos carbapenêmicos, este representa uma boa alternativa frente ao tratamento de infecções graves provenientes de *E. coli*, pois estes apresentam amplo espectro de ação e são estáveis a hidrólise das β -lactamases (LIVERMORE, 1995; CAMARGO, 2011).

Desde 2010, o CLSI recomenda a pesquisa dos genes de resistência para KPC em isolados de enterobactérias com resistência a cefalosporinas de terceira geração (Ceftriaxone, Cefotaxime e Ceftazidime) e sensibilidade diminuída aos carbapenens (Imipenem, Meropenem e Ertapenem) pela metodologia de disco-difusão ou MIC (CLSI, 2018). Nestes casos é necessário realizar ensaios moleculares para a pesquisa dos genes de resistência aos β -lactâmicos. Como uma das cepas apresentou este perfil, realizamos a pesquisa dos genes nesta e demais cepas para confirmação do perfil de resistência. Somente a cepa com as características determinadas pelo CLSI realmente apresentou o gene *bla_{KPC}*.

Além da classe de antimicrobianos β -lactâmicos, foram avaliadas mais seis classes, sendo elas: aminoglicosídeos; fosforados; fluoquinolonas; glicilciclina; nitrofurano e sulfonamidas.

Segundo o CLSI de 2017 a categoria de susceptibilidade classificada como "intermediária" apresenta isolados com halo de inibição entre a faixa de resistência e

de sensibilidade das bactérias, sendo este determinado pelo diâmetro do halo no método de difusão em agar com disco em placa (CLSI, 2017).

Uma das cepas apresentou susceptibilidade intermediária para Ciprofloxacino, e uma segunda cepa com susceptibilidade intermediária a Tobramicina e Nitrofurantóina.

Todas as cepas apresentaram susceptíveis à fosfomicina, medicamento de espectro ampliado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas associadas à ITU, possui rápida ação bactericida em concentrações baixas, baixa resistência bacteriana, ação antiadesiva, alta concentração a nível urinário por administração oral e possologia cômoda, pois é administrada em dose única.

Observamos a prevalência do gene *aer* nas cepas de UPEC deste estudo, que não corroboram com os dados encontrados por Bahalo *et al.* (2013), Eusébio *et al.* (2016) e Hassan *et al.* (2018), que detectaram a prevalência deste gene em cepas de *E. coli* diarreïnogênicas (VÁZQUEZ *et al.*, 1992), relataram a prevalência de *pap*, *aer* e *hly* em *E. coli* isoladas de hemoculturas. Além disso, chamamos atenção para a associação desse gene com os genes *pap* e *sfa* para a cepa 1. Assim como a associação deste gene (*aer*) com a da ilha de patogenicidade para as cepas 5 e 7. Também enfatizamos a presença do gene *pai* nas cepas 3 e 6.

Quatro cepas (36%) não apresentaram nenhum dos seis genes de virulência investigados neste estudo, corroborando com Oliveira *et al.* (2011) que relataram que 10% das cepas UPECs analisadas não apresentaram positividade para os mesmos marcadores utilizados. Blanco *et al.* (1997) observaram ausência dos genes *hly*, *pap* e *sfa* nas cepas investigadas. Diferentemente, Yun *et al.* (2014) detectaram todos esses fatores de virulência em 64 cepas de UPECs analisadas, sendo 15 cepas isoladas de crianças com UTI e 49 cepas isoladas de crianças com bacteriúria assintomática.

Em contra partida a maior parte dos relatos encontrados na literatura obtivemos inversão de filogrupo, visto que o grupo prevalente foi D seguido de A e B2. Recentemente foi verificado que nas ITU, a associação com os grupos filogenéticos B2 e D tem sido relatada como a mais prevalente (CHAKRABORTY *et al.*, 2015). Artigos como os de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), Nowrouzian *et al.* (2006), Derakhshandeh *et al.*, (2013) e Chakraborty *et al.* (2015), apontam a prevalência de infecções do trato urinário por *E. coli* dos filogrupos B2 e D que podem causar reinfecção e levar o indivíduo a morte. Já os filogrupos A e B1 apresentam um melhor

prognóstico quando comparados aos grupos D e B2. De acordo com Nowrouzian *et al.* (2006) os grupos filogenéticos B2 e D comumente apresentam fatores de virulência e causam infecções extra-intestinais.

Ao associarmos o perfil filogenético com os fatores de virulência pesquisados podemos destacar que algumas cepas do filogrupo D não apresentaram nenhum dos fatores de virulência aqui investigados. O número reduzido de cepas usadas nesta pesquisa, não permitiu termos uma conclusão sobre os fatores de virulência associados ao grupo filogenético, se fazendo necessário outros estudos para confirmar essa relação. Lee *et al.* (2015) e Stoppe *et al.* (2017) observaram que a relação entre filogenia, hospedeiros e fatores de virulência não é totalmente compreendida. Outros fatores relacionados ao hospedeiro podem estar envolvidos como: clima, alimentação e hábitos. Além da possibilidade de outros genes estarem envolvidos.

Yasumura e Kawakita (1963) estabeleceram a linhagem VERO a partir de células epiteliais extraídas dos rins de macacos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*), após passagens seriadas (BRETAS, 2011). Ultimamente, as células VERO são usadas na avaliação da citotoxicidade de biomateriais, detecção de toxinas, teste de eficácia, teste de meios e micoplasma (TAKATA *et al.*, 1994; UNCHERN, 2000; ALVES *et al.*, 2008).

Nosso estudo usou a célula VERO por apresentar características renais semelhantes às células renais dos seres humano. Tendo em vista que as cepas de *E. coli* foram isoladas pacientes da nefrologia.

Nossas cepas apresentaram diferentes perfis de aderência e não aderência. Portanto, nosso estudo difere dos resultados obtidos por Gonçalves e Kobayashi (2015), onde todas as cepas testadas aderiram as células VERO. Ao associarmos a aderência com o grupo filogenético foi possível observar que o padrão de aderência não estava associado a nenhum dos grupos filogenéticos.

Todas as cepas analisadas invadiram as células VERO, mostrando que os isolados foram capazes de entrar em células do epitélio renal. Entretanto, a invasão não foi associada aos genes de virulência específicos analisados neste estudo e nem a grupos filogenéticos.

A aderência e a Invasão são pontos decisivos na infecção celular e determinantes no estabelecimento de doenças. A capacidade de aderir ou invadir pode ser a causa da infecção ocasionada pelas bactérias. Sendo esses mecanismos

(adesão e invasão) ainda inexplicáveis (GONÇALVES; KOBAYASHI, 2015). A presença de invasinas também é um fator de virulência importante e pouco conhecida em cepas de *E. coli* extraintestinais patogênicas por proteger as bactérias das defesas do organismo, promovendo infecção (MOKADY; GOPHNA; RON, 2006; SANTOS *et al.*, 2015).

Independente da quantificação de biofilme formado, todas as cepas foram capazes de invadir a linhagem celular VERO. Logo, a capacidade de formar biofilme, não está diretamente associada à adesão e nem a invasão. Além disso, a presença de genes de virulência investigados neste estudo também não pôde ser associada à formação de biofilme. Reisner *et al.* (2006) utilizando 324 cepas relataram variação na formação de biofilme em cepas de *E. coli*, mas não conseguiram estabelecer uma conclusão entre biofilme com cepas patogênicas causadoras de infecção.

Ao compararmos os grupos filogenéticos com a diversidade gênica obtida no PFGE, não notamos relação entre esses dois parâmetros de estudos. Algumas cepas apresentaram grupos filogenéticos diferentes e fatores de virulência similares sem possuir proximidade na diversidade gênica. Uma justificativa para tal relação seria a ocorrência de recombinação ou mutação, levando a dissociação na análise por PFGE e filogenia. Já outras cepas mostraram os mesmos fatores de virulência e não possuem similaridade alguma. Isso indica que a importância do PFGE, pois esta técnica permite agrupar os isolados, evidenciando suas variações genômicas (MAGALHÃES *et al.*, 2005). Além de determinar a similaridade entre as cepas através do coeficiente de Dice (1945), o PFGE, correlaciona os pares isolados, originados de um ancestral comum, que sofreram algum tipo de evento genético (BEDENDO; BORELLI; PIGNATARI, 2001). Os fatores de virulência podem ser adquiridos de acordo com mutações, ocorrência de duplicação, deleção e recombinação, e podem ser passados pelas ilhas de patogenicidade por transferência genética horizontal (CALDART *et al.*, 2016).

Das cepas usadas em nosso estudo, duas foram isoladas do mesmo paciente, com infecção urinária em períodos diferentes, e não apresentaram similaridade, mas são do mesmo grupo filogenético. Ao relacionarmos essas duas cepas com os resultados dos fatores de virulência obtidos, estas exibiram resultados diferentes entre si. Considerando que as infecções por UPEC tem como fonte principal o trato digestório do próprio paciente, possivelmente foi adicionado o gene *aer* na cepa da segunda infecção, pois a cepa isolada primeiro apresentava apenas o gene *pai* e a

segunda além do gene pai, apresentou o gene *aer*, apontando para um ganho de informação gênica, ou uma nova infecção de origem distinta.

A técnica de MEV foi utilizada para as cepas de *E. coli* que apresentaram maior intensidade de invasão. A MEV foi realizada por método de fratura para a visualização das bactérias, permitindo a localização das cepas de *E. coli* no interior das células VERO. Dessa forma foi possível obter uma imagem com alto poder de resolução para este evento. Além disso a MEV apresenta excelente profundidade de foco, permitindo uma análise com grandes aumentos de superfícies irregulares (OLLEY; BASSET,1984).

CONCLUSÃO

O uso contínuo de antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, ainda ocorre de forma indiscriminada, assim como as sulfonamidas e β -lactâmicos. Já a fosfomicina por ser mais usada a nível hospitalar e com pouca divulgação a nível populacional, se mostrou um excelente medicamento para o tratamento de ITU, assim como a nitrofurantoína que é de baixo custo e de fácil posologia. A fosfomicina pode ser uma excelente escolha para tratamento das ITU, por ser de amplo espectro, baixa resistência e fácil posologia.

Faz-se necessário a pesquisa de outros genes de resistência para as cepas que apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos β -lactâmicos.

A re-infecção por *E. coli* pode ser causada pela mesma ou por cepas com características distintas. As cepas estudadas ganharam ou perderam características fenotípicas e genotípicas ao longo de sua evolução, tendo em vista que as cepas possuem a mesma origem e não apresentam as mesmas propriedades.

Cepas clínicas de UPEC podem apresentar ou não os fatores de virulência pesquisados, indicando que não há necessidade da presença destes fatores de virulência para causarem infecção do trato urinário. Contudo, a quantidade de fatores de virulência pesquisados em nosso estudo, tendo em vista que a *E. coli* possui uma ampla variedade, que permitem a bactéria colonizar com sucesso o trato urinário. Portanto, a identificação de outros fatores de virulência representa uma importante ferramenta para se compreender melhor a patogênese deste tipo de infecção.

Pesquisas adicionais são necessárias para afirmar a existência de padrões relacionando a distribuição do grupo filogenético com diferentes fatores associados aos hospedeiros e virulência genética, permitindo a previsão do tipo de estirpe *E. coli* seria prevalente em diferentes climas, localizações geográficas e/ou populações.

A formação de biofilme depende de vários fatores, como composição do meio de crescimento e superfície de formação de biofilme. A *E. coli* pode responder de diferentes maneiras as mudanças nas condições ambientais. Além disso, não foi possível identificar uma associação de biofilme com cepas patogênicas devido a variações de fatores envolvidos no teste de formação de biofilme.

Cepas clínicas de UPEC, mesmo sendo geneticamente relacionadas podem, apesar de patogênicas, apresentar padrões distintos em relação à susceptibilidade a

antimicrobianos, habilidade de aderir e invadir células epiteliais de linhagem e à possuírem genes relacionados a virulência e resistência a antimicrobianos.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é capaz de avaliar ultra-estruturalmente a aderência e invasão em células VERO, pois estas são capazes de aderir formando pontes citoplasmáticas, além de formarem filamentos e invadirem as células.

Os fatores analisados não apresentam relação com o processo de invasão a células VERO e capacidade de causar doença nos pacientes estudados.

O surgimento de cepas com diferentes fatores de virulência e resistência, formas de aderência, formação de biofilme, pertencência a diferentes grupos filogenéticos faz com que as UPECs sejam as mais prevalentes nos casos de ITU. Com isso se faz importante a continuação de sua caracterização fenotípica e genotípica para determinarmos os principais determinantes desta bactéria em causar infecção, para estabelecermos o melhor tratamento e/ou imunização como forma de reduzir a prevalência deste microrganismo na ITU.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. *et al.* **Tipagem genética de microrganismos**. 2003. 27 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Molecular) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2003.
- ALVES, P.M.M.; CARRONDO, M.J.T.; CRUZ, P.E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: MORAIS, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. (Eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais**: de biofármacos à terapia gênica. São Paulo: Roca, 2008. p. 2-14.
- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, London, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980. DOI: 10.1098/rstb.1980.0049. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.1980.0049?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 12 abr. 2018.
- ANVISA. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à Saúde**. Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas. Brasília: Anvisa, 2013.
- ARSLAN, H. *et al.* Risk factors for ciprofloxacin resistance among Escherichia coli strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. **J Antimicrob Chemother**, London, v. 56, n. 5, p.914-918, 2005. DOI: 10.1093/jac/dki344. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dki344>. Acesso em: 12 abr. 2018.
- ASSIS, D.M.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4004083.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2018.
- BABY, S.; KARNAKER, V.K.; GEETHA, R.K. Phenotypic and molecular characterization of haemolysins in relation to antibiotic resistance profile among uropathogenic Escherichia coli (UPEC). **Medical science (Tamilnadu)**, India, v. 22, n. 90, p. 209-217, 2018. Disponível em: http://www.discoveryjournals.org/medical-science/current_issue/v22/n90/A13.pdf. Acesso em: 7 jun. 2018.
- BAHALO, S. *et al.* Detection of Some Virulence Factors of Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infection Isolated of Children in Shahrekord Iran by Multiplex PCR. **Middle East J Sci Res**, Pakistan, v. 14, n. 1, p. 29-32, 2013. Disponível em: [https://www.idosi.org/mejsr/mejsr14\(1\)13/6.pdf](https://www.idosi.org/mejsr/mejsr14(1)13/6.pdf). Acesso em: 19 ago. 2018.
- BAHRANI-MOUGEOT, F.K. *et al.* Identification of putative urovirulence genes by subtractive cloning. **J Infect Dis**, United States, v. 183, suppl. 1, p. S21-S23, 2001. DOI: 10.1086/318845. Disponível em: https://academic.oup.com/jid/article/183/Supplement_1/S21/2191044?login=false. Acesso em: 10 abr. 2018.

BARBER, A.F. *et al.* Urinary tract infections current and emerging management strategies. **Clin Infect Dis**, United States, v. 57, n. 5, p. 719-724, 2013. DOI: 10.1093/cid/cit284. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3739462/>. Acesso em: 17 set. 2018.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli. **Infection**, Germany, v. 18, n. 5, p. 294-298, 1990. DOI: 10.1007/BF01647010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01647010>. Acesso em: 17 set. 2018.

BEDENDO, J.; BORELLI, S.D.; PIGNATARI, A.C.C. Tipagem de enterococcus faecalis por pulsed-field gradient gel electrophoresis e polymerase chain reaction. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Paraná, v. 5, n. 1, p. 9-15, 2001. Disponível em: <https://ojs.revistasunipar.com.br/index.php/saude/article/view/1100>. Acesso em: 19 ago. 2018.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. **Int J Nephrol**, London, v. 2012, 681473, 2012. DOI: 10.1155/2012/681473. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/22506110/>. Acesso em: 10 abr. 2018.

BIOMÉRIEUX. **VITEK® MS**: Microbiology Powered by Mass Spectrometry. United States: Biomérieux, 2018. Disponível em: https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18_vitekms_v7-digital.pdf. Acesso em: 7 out. 2018.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS Suppl**, v. 121, n. 136, p. 1-58, 2013. DOI: 10.1111/apm.12099. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.12099>. Acesso em: 10 abr. 2018.

BLANCO, M. *et al.* Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic Escherichia coli strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Res Microbiol**, Paris, v. 148, n. 9, p. 745-755, 1997. DOI: 10.1016/s0923-2508(97)82450-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0923250897824503?via%3Dihub>. Acesso em: 13 abr. 2018.

BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the ctx-m enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004. DOI: 10.1128/aac.48.1.1-14.2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>. Acesso em: 4 abr. 2018.

BORGES, C.A. *et al.* Shiga Toxigenic and Atypical Enteropathogenic Escherichia coli in the Feces and Carcasses of Slaughtered Pigs. **Foodborne Pathog Dis**, United States, v. 9, n. 12, p. 1119-1125, 2012. DOI: 10.1089/fpd.2012.1206. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2012.1206>. Acesso em: 13 maio 2018.

BOYD, E.F.; HARTL, D.L. Chromosomal Regions Specific to Pathogenic Isolates of Escherichia coli Have a Phylogenetically Clustered Distribution. **J Bacteriol**, United States, v. 180, n. 5, p. 1159-1165, 1998. DOI: 10.1128/jb.180.5.1159-1165.1998.

Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.180.5.1159-1165.1998>. Acesso em: 13 jan. 2018.

BRETAS, R.M. **Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais**. 2011. 154 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2011.

BUSH, K.; FISHER, J.F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. **Annu Rev Microbiol**, United States, v. 65, p. 455-478, 2011. DOI: 10.1146/annurev-micro-090110-102911. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-090110-102911>. Acesso em: 13 abr. 2018.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010. DOI: 10.1128/AAC.01009-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01009-09>. Acesso em: 13 abr. 2018.

BUSH, K; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995. DOI: 10.1128/aac.39.6.1211. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.39.6.1211>. Acesso em: 13 abr. 2018.

CALDART, E.T. *et al.* Phylogenetic Analysis: basic concepts and its use as a tool for virology and molecular epidemiology. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v. 44, n. 1, 20, 2016. DOI: 10.22456/1679-9216.81158. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/81158>. Acesso em: 17 ago. 2018.

CAMARGO, A.L.P.B. **Caracterização de betalactamases de espectro estendido e determinação de grupos filogenéticos em isolados de Escherichia coli recuperados de pacientes em um hospital universitário de São Paulo**. 2011. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CARDOSO, W.M.; SILVA, G.G. **Microbiologia em análises clínicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Merck, 1989.

CARMO, M.S. *et al.* Detecção de betalactamases de espectro estendido (ESBL) em isolados de Escherichia coli uropatogênicas (UPECs) oriundos de pacientes da comunidade. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 41, n. 4, p. 419-426, 2012. DOI: 10.5216/rpt.v41i4.21708. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/iptsp/article/view/21708>. Acesso em: 25 maio 2018.

CARTELLE, M. *et al.* High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v. 48, n. 6, p. 2308-2313, 2004. DOI: 10.1128/aac.48.6.2308-2313.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC415568/>. Acesso em: 2 abr. 2018.

CARVALHO, C.I. Infecção do trato urinário associado às gestantes e o papel do profissional farmacêutico no tratamento farmacoterapêutico. **FACIDER Revista Científica**, Mato Grosso, n. 7, p. 1-18, 2015. Disponível em: <http://revista.sei-cesucol.edu.br/index.php/facider/article/view/122>. Acesso em: 10 jan. 2018.

CDC. **Urinary Tract Infection (UTI) Event for Long-term Care Facilities**. Georgia: CDC, 2012. Disponível em: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/ltc/lcf-uti-protocol_final_8-24-2012.pdf. Acesso em: 16 dez. 2017.

CHAKRABORTY, A. *et al.* Characterization of Escherichia coli Phylogenetic Groups Associated with Extraintestinal Infections in South Indian Population. **Ann Med Health Sci Res**, India, v. 5, n. 4, p. 241-246, 2015. DOI: 10.4103/2141-9248.160192. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4512115/>. Acesso em: 15 dez. 2017.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. **Appl Environ Microbiol**, United States, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000. DOI: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92342/>. Acesso em: 18 maio 2018.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28. ed. CLSI Supplement M100. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. Disponível em: https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf. Acesso em: 2 abr. 2018.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement**. CLSI Supplement M100-S24. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=59202a0696b7e4d462166956&assetKey=AS%3A496054988533760%401495280134033>. Acesso em: 2 abr. 2018.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27. ed. CLSI Supplement M100. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. Disponível em: https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf. Acesso em: 2 abr. 2018.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev.**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/36/2/380/565595>. Acesso em: 14 jun. 2018.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de cepas: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DERAKHSHANDEH, A. *et al.* Phylogenetic analysis of Escherichia coli strains isolated from human samples. **Mol Biol Res Commun.**, Iran, v. 2. n. 4. p. 143-149, 2013. DOI:

10.22099/MBRC.2013.1822. Disponível em: https://mbrc.shirazu.ac.ir/article_1822_119bce9ed57f4bf4c888d20856596514.pdf. Acesso em: 10 jan. 2018.

DERAKHSHANDEH, A. *et al.* Virulence factors, antibiotic resistance genes and genetic relatedness of commensal *Escherichia coli* isolates from dogs and their owners. **Microb Pathog.**, London, v. 116, p. 241-245, 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.01.041. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401017304540>. Acesso em: 17 out. 2018.

DICE, L.R. Measures of amounts of ecologic association between species. **Ecology**, United States, v. 26, n. 3, p. 297-302, 1945. DOI: 10.2307/1932409. Disponível em: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2307/1932409>. Acesso em: 14 jun. 2018.

DIEDRICH, L.N. **Avaliação da relação dos grupos filogenéticos com a formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)**. 2017. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2017.

DONNENBERG, M.S.; WHITTAM, T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, United States, v. 107, n. 5, p. 539-548, 2001. DOI: 10.1172/JCI12404. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/12404>. Acesso em: 7 jan. 2018.

DOYLE, D. *et al.* Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. **J Clin Microbiol**, United States, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012. DOI: 10.1128/jcm.02117-12. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02117-12>. Acesso em: 12 jun. 2018.

DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technol Biotechnol**, Croatia, v. 46, n. 1, p. 11-21, 2008. Disponível em: <https://hrcak.srce.hr/file/34842>. Acesso em: 6 mar. 2018.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 2. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1962.

EUSÉBIO, A. *et al.* *Escherichia coli* nas infecções urinárias da comunidade: comensal ou patogênica?. **Acta Urológica Portuguesa**, Portugal, v. 33, n. 2, p. 37-42, 2016. DOI: 10.1016/j.acup.2016.02.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2341402216300015?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jun. 2018.

FARIA JUNIOR, C. **Caracterização de cepas de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenens isoladas no Distrito Federal**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

FRENCH, L. Urinary tract infection in woman. **Women's health**, [S.l.], v. 6. p. 24-29, 2006.

GERMANO, P.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

GIRARDINI, L.K. *et al.* Phylogenetic and pathotype analysis of *Escherichia coli* swine isolates from Southern Brazil. **Pesq Vet Bras**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 374-378, 2012. DOI: 10.1590/S0100-736X2012000500002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/4mSLVpWbS39XFBFMXHSDJsx/?lang=en#>. Acesso em: 12 jun. 2018.

GIURIATTI, J. **Detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) em isolados de Salmonella provenientes de carnes de frango**. 2017. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, 2017.

GONCALVES, M.C.; KOBAYASHI, R.K.T. Análise de adesão e invasão de *Escherichia coli* patogênica em células de linhagem. In: Encontro anual de Iniciação Científica da UEL, 24., 2015, Londrina. **Anais...** Londrina: UEL, 2015. p. 1-4.

GOULART, V.A.M.; RESENDE, R.R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**, Belo Horizonte, v. 1, n. 3, p. 23-28, 2013.

GUERRA, G.V.Q.L. *et al.* Exame Simples de Urina no Diagnóstico de Infecção Urinária em Gestantes de Alto Risco. **Rev Bras Ginecol Obstet**, São Paulo, v. 34, n. 11, p. 488-493, 2012. DOI: 10.1590/S0100-72032012001100002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbgo/a/vrbDdTqd9SbF8DFZT9gVkJt>. Acesso em: 7 jan. 2018.

HACKER, J. *et al.* Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. **Infect Immun**, v. 61, n. 2, p. 544-550, 1993. DOI: 10.1128/iai.61.2.544-550.1993. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.61.2.544-550.1993>. Acesso em: 14 jan. 2018.

HACKER, J. *et al.* Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol Microbiol**, Oxford, v. 23, n. 6, p.1089-1097, 1997. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 14 fev. 2018.

HACKER, J.; KAPER, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annu Rev Microbiol**, California, v. 54, p. 641-679, 2000. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.641. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.micro.54.1.641>. Acesso em: 12 fev. 2018.

HALL, J.E.; GUYTON, A.C. **Guyton & Hall: Fundamentos de Fisiologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2011.

HARADA, S.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. **Korean J Lab Med**, Korea, v. 28, n. 6, p. 401-412, 2008. DOI: 10.3343/kjlm.2008.28.6.401. Disponível em: <https://www.annlabmed.org/journal/view.html?doi=10.3343/kjlm.2008.28.6.401>. Acesso em: 23 out. 2018.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. (Eds.). **Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

HASSAN, H.E.M. *et al.* Genotypic detection of the virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic and urinary tract infected patients in Khartoum State, Sudan. **Afr J Microbiol Res**, Nigeria, v. 12, n. 9, p. 230-236, 2018. DOI: 10.5897/AJMR2017.8771. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/2B8062956221>. Acesso em: 10 abr. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. **Sunitinib y sorafenib no son efectivos como terapias adyuvantes para cáncer renal**. United States: NCI 2016. Disponível em: <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2016/adyuvante-angiogenesis-renal>. Acesso em: 17 maio 2018.

JOHNSON, J.R.; STELL, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J Infect Dis**, v. 181, n. 1, p. 261-272, 2000. DOI: 10.1086/315217. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/181/1/261/893888>. Acesso em: 10 jan. 2018.

JONES, C.H. *et al.* FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 92, n. 6, p. 2081-2085, 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.6.2081. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC42427/>. Acesso em: 10 jan. 2018.

JUC, R.U.; COLOMBARI, E.; SATO, M.A. Importância do sistema nervoso no controle da micção e armazenamento urinário. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 55-60, 2011. DOI: 10.7322/abcs.v36i1.76. Disponível em: <https://www.portalnepas.org.br/abcs/article/view/76>. Acesso em: 17 dez. 2017.

JUSTICE, S.S. *et al.* Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 103, n. 52, p.19884-19889, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0606329104. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1750882/>. Acesso em: 21 jan. 2018.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 2, p. 123-140, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro818. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>. Acesso em: 17 dez. 2017.

KORHONEN, T.K. *et al.* Serotype, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. **Infect Immun**, Washington, v. 48, n. 2, p. 486-491, 1985. DOI: 10.1128/iai.48.2.486-491.1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC261353/>. Acesso em: 21 jan. 2018.

KUMARASAMY, K.K. *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, New York, v. 10, n. 9, p. 597-602, 2010. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(10\)70143-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(10)70143-2/fulltext). Acesso em: 10 mar. 2018.

LAHEY HEALTH. **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes.** Massachusetts: Lahey Health, 2017. Disponível em: <http://www.lahey.org/Studies/>. Acesso em: 20 jul. 2018.

LANGERMANN, S. *et al.* Prevention of mucosal Escherichia coli infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. **Science**, New York, v. 276, n. 5312, p. 607-611, 1997. DOI: 10.1126/science.276.5312.607. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.276.5312.607>. Acesso em: 10 fev. 2018.

LARA, F.B.M. *et al.* Virulence markers and phylogenetic analysis of Escherichia coli strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. **Front Microbiol**, Switzerland, v. 8, 146, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00146. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5290387/>. Acesso em: 10 fev. 2018.

LAURETTI, L. *et al.* Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 43, n. 7, p.1584-1590, 1999. DOI: 10.1128/AAC.43.7.1584. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.43.7.1584>. Acesso em: 11 fev. 2018.

LAVAGNOLI, S.L. *et al.* Factors associated with acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Rev Latino-Am Enfermagem**, São Paulo, v. 25, e2935, 2017. DOI: 10.1590/1518-8345.1751.2935. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rlae/a/qjcxvVVJfpc4FJn7L9LqLP/?lang=en>. Acesso em: 27 fev. 2018.

LAY JR, J.O. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. **Trends Analyt Chem**, Amsterdam, v. 19, n. 8, p. 507-516, 2000. DOI: 10.1016/S0165-9936(00)00027-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993600000273>. Acesso em: 27 fev. 2018.

LEE, J.B.L; NEILD, G.H. Urinary tract infection. **Medicine (Abingdon)**, United Kingdom, v. 35, n. 8, p. 423-428, 2007. DOI: 10.1016/j.mpmed.2007.05.009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357303907001466>. Acesso em: 10 jan. 2018.

LEE, J.H. *et al.* Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. **Lett Appl Microbiol**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 84-90, 2016. DOI: 10.1111/lam.12517. Disponível em: <https://academic.oup.com/lambio/article-abstract/62/1/84/6699720?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 27 ago. 2018.

LEOMIL, L. *et al.* Characterization of two major groups of diarrheagenic Escherichia coli O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v. 249, n. 2, p. 335-342, 2005. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.06.030. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/249/2/335/569936>. Acesso em: 23 jun. 2018.

LIVERMORE, D.M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995. DOI: 10.1128/CMR.8.4.557. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.8.4.557>. Acesso em: 23 jun. 2018.

MAGALHÃES, V.D. *et al.* Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005. Disponível em: <https://ses.sp.bvs.br/local/File/1033.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2018.

MARRS, C.F. *et al.* Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral Escherichia coli. **J Med Microbiol**, London, v. 51, n. 2, p. 138-142, 2002. DOI: 10.1099/0022-1317-51-2-138. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/0022-1317-51-2-138>. Acesso em: 10 abr. 2018.

MARTINEZ, J.J. *et al.* Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J**, London, v. 19, n. 12, p. 2803-2812, 2000. DOI: 10.1093/emboj/19.12.2803. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/19.12.2803>. Acesso em: 27 dez. 2017.

MAYHOFER, P.H. *et al.* Microstructural design of hard coatings. **Prog Mater Sci**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 1032-1114, 2006. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2006.02.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079642506000119>. Acesso em: 17 out. 2018.

MIDDENDORF, B. *et al.* The pathogenicity islands (PAIs) of the uropathogenic Escherichia coli strain 536: island probing of PAI. **J Infect Dis**, Illinois, v. 183, suppl. 1, p. S17-S20, 2001. DOI: 10.1086/318843. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/30109407>. Acesso em: 13 fev. 2018.

MOHAMED, J.A. *et al.* Association of Putative Enteroaggregative Escherichia coli Virulence Genes and Biofilm Production in Isolates from Travelers to Developing Countries. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 45, n. 1, p. 121-126, 2007. DOI: 10.1128/JCM.01128-06. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01128-06>. Acesso em: 20 jul. 2018.

MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E.Z. Virulence factors of septicemic Escherichia coli strains. **Int J Med Microbiol**, Germany, v. 295, n. 6-7, p. 455-462, 2006. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.07.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422105001013>. Acesso em: 20 jul. 2018.

MÜHLDORFER, I.; ZIEBUHR, W.; HACKER, J. Escherichia coli in urinary tract infections. In: SUSSMAN, M. (Ed.). **Molecular medical microbiology**: volume 2. London: Academic Press, 2001. p. 1515-1540.

MULVEY, M.R. *et al.* Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase producing Salmonella isolate identified in Canada. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 41, n. 1, p. 460-462, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.1.460-462.2003. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.41.1.460-462.2003>. Acesso em: 10 out. 2018.

MUNKHDELGER, Y. *et al.* Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. **J Infect Dev Ctries**, Italy, v. 11, n. 1, p. 51-57, 2017. DOI: 10.3855/jidc.7903. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/28141590>. Acesso em: 10 out. 2018.

MUNOZ-PRICE, L.S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**, New York, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(13\)70190-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(13)70190-7/fulltext). Acesso em: 17 fev. 2018.

MURRAY, D.B. *et al.* Involvement of glutathione in the regulation of respiratory oscillation during a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology (Reading)**, London, v. 145, n. 10, p. 2739-2745, 1999. DOI: 10.1099/00221287-145-10-2739. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-145-10-2739>. Acesso em: 28 dez. 2017.

NEIDHARDT, F.C. Bacterial genetics. In: RYAN, K.J.; RAY, C.G. (Eds.). **Sherris Medical Microbiology: an introduction to infectious diseases**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2004. p. 53-74.

NICOLLE, L.E. Urinary tract pathogens in complicated infection and in elderly individuals. **J Infect Dis**, Illinois, v. 183, suppl 1, p. S5-S8, 2001. DOI: 10.1086/318844. Disponível em: https://academic.oup.com/jid/article/183/Supplement_1/S5/2191106. Acesso em: 17 dez. 2017.

NOGUEIRA, J.M.R.; MIGUEL, L.F.S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. (Orgs.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde**: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2009. p. 221-397.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. **Trends Mol Med**, Oxford, v. 18, n. 5, p.263-272, 2012. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.03.003. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914\(12\)00037-8?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471491412000378%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(12)00037-8?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471491412000378%3Fshowall%3Dtrue) . Acesso em: 4 jan. 2018.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis**, Georgia, v. 17, n. 10. p. 1791-1798, 2011. DOI: 10.3201/eid1710.110655. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/10/11-0655_article. Acesso em: 4 jan. 2018.

NOWROUZIAN, F.L.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A.E. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factor sand adherence to colonic cells. **Microbes Infect**, Paris, v. 8, n. 3, p. 834-840, 2006. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.10.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457905003795>. Acesso em: 15 jun. 2018.

OELSCHLAEGER, T.A.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Virulence factors of uropathogens. **Curr Opin Urol**, London, v. 12, n. 1, p. 33-38, 2002. DOI: 10.1097/00042307-200201000-00007. Disponível em: https://journals.lww.com/urology/Abstract/2002/01000/Virulence_factors_of_uropathogens.7.aspx. Acesso em: 17 jan. 2018.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 37, n. 6, p.1661-1669, 1999. DOI: 10.1128/JCM.37.6.1661-1669.1999. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.37.6.1661-1669.1999>. Acesso em: 6 jan. 2018.

OLIVEIRA, F.A. *et al.* Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic Escherichia coli strains. **Genet Mol Res**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 4114-4125, 2011. DOI: 10.4238/2011.October.31.5. Disponível em: <https://www.funpecrp.com.br/gmr/year2011/vol10-4/pdf/gmr1396.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2018.

OLIVEIRA, S.M.; SANTOS, L.L.G. Infecção do trato urinário: estudo epidemiológico em prontuários laboratoriais. **Journal Health NPEPS**, Mato Grosso, v. 3, n. 1, p. 198-210, 2018. DOI: 10.4238/2011.October.31.5. Disponível em: <https://periodicos.une.br/index.php/jhnpeps/article/view/2843>. Acesso em: 6 ago. 2018.

OLLEY R.H.; BASSETT D.C. On the lamellar morphology of isotactic polypropylene spherulites. **Polymer**, Texas, v. 25, n. 7, p. 935-943, 1984. DOI: 10.1016/0032-3861(84)90076-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0032386184900764>. Acesso em: 21 jul. 2018.

OMLI, R. *et al.* Pad per day usage, urinary incontinence and urinary tract infections in nursing home residents. **Age Ageing**, London, v. 39, n. 5, p. 549-554, 2010. DOI: 10.1093/ageing/afq082. Disponível em: <https://academic.oup.com/ageing/article/39/5/549/41189>. Acesso em: 27 dez. 2017.

OSTOLAZA, H. *et al.* Alpha-haemolysin from E. coli. Purification and self-aggregation properties. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 280, n. 2, p.195-198, 1991. DOI: 10.1016/0014-5793(91)80291-a. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0014-5793%2891%2980291-A>. Acesso em: 18 jan. 2018.

OSANO, E. *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallolactamase found in a clinical isolate of Serratia marcescens that shows imipenem resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 38, n. 1, p. 71-78, 1994. DOI: 10.1128/AAC.38.1.71. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.38.1.71>. Acesso em: 13 abr. 2018.

OTT, M. *et al.* Gene clusters for S fimbrial adhesin (sfa) and F1C fimbriae (foc) of Escherichia coli: comparative aspects of structure and function. **J Bacteriol**, Washington, v. 170, n. 9, p. 3983-3990, 1988. DOI: 10.1128/jb.170.9.3983-3990.1988. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.170.9.3983-3990.1988>. Acesso em: 18 jan. 2018.

PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C.M.C.B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 995-1001, 2014. DOI: 10.1590/S0034-8910.2014048004825. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/kGg6bpmc9rgkSd7QjWc46cd/?lang=en>. Acesso em: 16 fev. 2018.

PARSEK, M.R.; SINGH, P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annu Rev Microbiol**, California, v. 57, p. 677-701, 2003. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090720. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>. Acesso em: 7 jan. 2018.

PATHAK, P. *et al.* Prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBL) and metallo beta lactamases (MBL) mediated resistance in gram negative bacterial pathogens. **TUJM**, Nepal, v. 4, n. 1, p. 49-54, 2017. DOI: 10.3126/tujm.v4i0.21677. Disponível em: <https://www.nepjol.info/index.php/tujm/article/view/21677>. Acesso em: 18 mar. 2018.

PENTEADO, A.P. *et al.* Dissemination of bla_{IMP-1} carrying integron In86 among Klebsiella pneumoniae isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23. **Diagn Microbiol Infect Dis**, New York, v. 63, n. 1, p. 87-91, 2009. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889308004136>. Acesso em: 18 mar. 2018.

PEREIRA, A.C.M. *et al.* Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. **Microb Pathog**, London, v. 45, n. 5-6, p. 310-314, 2008. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.07.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401008000983>. Acesso em: 10 abr. 2018.

PERSING, D.H. *et al.* (Eds.). **Molecular microbiology: diagnostic principles and practice**. Washington: ASM Press, 2004.

PINTO, F.M. *et al.* Prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. **Clin Biomed Res**, Rio Grande do Sul, v. 34, n. 1, p. 47-52, 2014. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/article/view/44412>. Acesso em: 17 fev. 2018.

PITOUT, J.D.D. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Front Microbiol**, Switzerland, v. 3, 9, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3261549/>. Acesso em: 17 fev. 2018.

POIREL, L. *et al.* Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.1.15-22.2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>. Acesso em: 10 fev. 2018.

POIREL, L. *et al.* Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. **Lancet Infect Dis**, New York, v. 10, n. 12, 832, 2010. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70279-6.

Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(10\)70279-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(10)70279-6/fulltext). Acesso em: 10 fev. 2018.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007. DOI: 10.1128/CMR.00001-07. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00001-07>. Acesso em: 13 abr. 2018.

RASKO, D.A. *et al.* Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. **J Infect Dis**, Illinois, v. 184, n. 8, p. 1041-1049, 2001. DOI: 10.1086/323602. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/184/8/1041/807249>. Acesso em: 12 fev. 2018.

REISNER, A. *et al.* In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. **J Bacteriol**, Washington, v. 188, n. 10, p. 3572-3581, 2006. DOI: 10.1128/JB.188.10.3572-3581.2006. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.188.10.3572-3581.2006>. Acesso em: 17 dez. 2018.

RIBOT, E.M. *et al.* Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis**, New York, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006. DOI: 10.1089/fpd.2006.3.59. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2006.3.59>. Acesso em: 14 jun. 2018.

RICE, L.B.; BONOMO, R.A. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: LORIAN, V. (Ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 441-447.

ROCCHETTI, T.T. **Detecção bacteriana e de genes de resistência a antimicrobianos pela técnica de PCR em tempo real em infecções de corrente sanguínea de pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos**. 2010. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. *et al.* Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 31, n. 2, e00079-17, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00079-17. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00079-17>. Acesso em: 4 mar. 2018.

ROSA, A.C. *et al.* Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Microbiol**, London, v. 47, n. 9, p. 781-790, 1998. DOI: 10.1099/00222615-47-9-781. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-47-9-781>. Acesso em: 7 jun. 2018.

ROSA, A.C. *et al.* Interactions of *Escherichia coli* strains of non-EPEC serogroups that carry eae and lack the EAF and stx gene sequences with undifferentiated and

differentiated intestinal human Caco-2 cells. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v. 200, n. 1, p. 117-122, 2001. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10702.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/200/1/117/549783>. Acesso em: 18 jun. 2018.

ROSSOLINI, G.M.; D'ANDREA, M.M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Microbiol Infect**, Paris, v. 14, suppl 1, p. 33-41, 2008. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)60473-0/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)60473-0/fulltext). Acesso em: 25 fev. 2018.

SALTOGLU, N. *et al.* Predictors for limb loss among patient with diabetic foot infections: an observational retrospective multicentric study in Turkey. **Clin Microbiol Infect**, Paris, v. 21, n. 7, p. 659-664, 2015. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.03.018. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(15\)00382-1/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(15)00382-1/fulltext). Acesso em: 11 jan. 2018.

SALTON, G.; MACIEL, M.J. Prevalência e perfil de resistência de bactérias isoladas em uroculturas de pacientes de uma cidade do interior do Rio Grande do Sul. **Ciência & Saúde**, Rio Grande do Sul, v. 10, n. 4, p. 194-199, 2017. DOI: 10.15448/1983-652X.2017.4.25451. Disponível em: <https://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/faenfi/article/view/25451>. Acesso em: 14 fev. 2018.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology, 2002.

SANTOS, P.A.; *et al.* Adhesion, invasion, intracellular survival and cytotoxic activity of strains of *Aeromonas* spp. in HEp-2, Caco-2 and T-84 cell lines. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 107, n. 5, p. 1225-1236, 2015. DOI: 10.1007/s10482-015-0416-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-015-0416-4>. Acesso em: 14 fev. 2018.

SANTOS, T.G. **Patotipagem, tipagem filogenética, determinação de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* uropatogênica**. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2018.

SCHMIDT, G. *et al.* The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity: cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity. **J Biol Chem**, Maryland, v. 273, v. 22, p. 13669-13674, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.22.13669. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)57809-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)57809-7/fulltext). Acesso em: 17 fev. 2018.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 17, n. 1, p.14-56, 2004. DOI: 10.1128/CMR.17.1.14-56.2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>. Acesso em: 17 fev. 2018.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada**. 5. ed. São Paulo: Jones & Bartlett, 2010.

SOUZA, C.O. *et al.* Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Rev Panamazonica Saude**, Pará, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016. DOI: 10.1128/CMR.17.1.14-56.2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>. Acesso em: 10 fev. 2018.

STOPPE, N.C. *et al.* Worldwide Phylogenetic Group Patterns of Escherichia coli from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. **Front Microbiol**, Switzerland, v. 8, 2512, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02512. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02512/full>. Acesso em: 15 ago. 2018.

SUBASHCHANDRABOSE, S.; MOBLEY, H.L.T. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. **Microbiol Spectr**, Washington, v. 3, n. 4, UTI-0015-2012. DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012>. Acesso em:

SVANBORG, C.; GODALY, G. Bacterial virulence in urinary tract infection. **Infect Dis Clin North Am**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 513-529, 1997. DOI: 10.1016/s0891-5520(05)70371-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552005703718>. Acesso em: 17 dez. 2017.

TAKATA, C.S. *et al.* Susceptibility of Vero cell line to vaccine strains of the measles virus. **Rev Saude Publica**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 209-212, 1994. DOI: 10.1590/s0034-89101994000300008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/ZnDd6FGW9WYtbD4w4vgSLQq/?lang=pt>. Acesso em: 10 ago. 2018.

TANG, B. *et al.* Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. **J Cell Biol**, New York, v. 120, n. 2, p. 325-338, 1993. DOI: 10.1083/jcb.120.2.325. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/120/2/325/14621/Molecular-cloning-characterization-subcellular>. Acesso em: 15 jun. 2018.

TEIXEIRA, L.M. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of Vagococcus fluvialis, including strains isolated from human sources. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2778-2781, 1997. DOI: 10.1128/jcm.35.11.2778-2781.1997. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.35.11.2778-2781.1997>. Acesso em: 18 maio 2018.

THANKAVEL, K. *et al.* Localization of a domain in the FimH adhesin of Escherichia coli type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. **J Clin Invest**, Michigan, v. 100, n. 5, p. 1123-1136, 1997. DOI: 10.1172/JCI119623. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/119623>. Acesso em: 17 fev. 2018.

TINOCO, M. *et al.* Polysaccharide of Escherichia coli in the prevention of recurrent urinary tract infection: An Evidence-Based Review. **Acta Med Port**, Portugal, v. 31, n. 3, p. 165-169, 2018. DOI: 10.20344/amp.9367. Disponível em: <https://www.acta medicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/9367>. Acesso em: 10 abr. 2018.

TISSIANI, A. C. *et al.* Escherichia coli uropatogênica: uma breve revisão sobre fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos. **NewsLab**, [S.l.], v. 147, p. 1-10, 2018. Disponível em: <https://newslab.com.br/escherichia-coli-uropatogenica-uma-breve-revisao-sobre-fatores-de-virulencia-e-resistencia-aos-antimicrobianos-newslab-147/>. Acesso em: 14 fev. 2018.

TORRES, E.J.L.; SOUZA, W.; MIRANDA, K. Comparative analysis of Trichuris muris surface using conventional, low vacuum, environmental and field emission scanning electron microscopy. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 196, n. 3-4, p. 409-416, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.02.026. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401713001386>. Acesso em: 14 mar. 2018.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991.

TROXELL, B.; HASSAN, H.M. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. **Front Cell Infect Microbiol**, Switzerland, v. 3, 59, 2013. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00059. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00059/full>. Acesso em: 7 fev. 2018.

UNCHERN, S. Basic techniques in animal cell culture. In: Drug Delivery System Workshop, 1999, Thailand. **Anais...** Pakistan: University of Peshawar, 2000. p. 1-30.

VÁZQUEZ, F. *et al.* Survey of Escherichia coli septicemia over a six-year period. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Germany, v. 11, n. 2, p. 110-117, 1992. DOI: 10.1007/BF01967061. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01967061>. Acesso em: 21 set. 2018.

VEIGA, C.L. **Os antibióticos na prática clínica**. Lisboa: Infecon, 1984.

VIEGAS, D.M.; SOARES, V.M. Prevalence of carbapenemase in Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems isolated in a tertiary referral hospital. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 2, p. 95-98, 2018. DOI: 10.5935/1676-2444.20180017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/prm38W3dd84CmRVsfbpml/?lang=en>. Acesso em: 12 abr. 2018.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009. Disponível em: <https://revistamundodasaude.emnuvens.com.br/mundodasaude/article/view/656>. Acesso em: 17 fev. 2018.

WALSH, T.R. *et al.* Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **Lancet Infect Dis**, New York, v. 11, n. 5, p. 355-362, 2011. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(11\)70059-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(11)70059-7/fulltext). Acesso em: 3 mar. 2018.

WALSH, T.R. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect**, Paris, v. 11, suppl 6, p. 2-9, 2005. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01264.x. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15300495>. Acesso em: 17 mar. 2018.

WELCH, R.A. *et al.* Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 99, n. 26, p. 17020-17024, 2002. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(11\)70059-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(11)70059-7/fulltext). Acesso em: 10 fev. 2018.

WILES, T.J.; KULESUS, R.R.; MULVEY, M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp Mol Pathol**, Netherlands, v. 85, n. 1, p. 11-19, 2008. DOI: 10.1016/j.yexmp.2008.03.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014480008000373>. Acesso em: 10 fev. 2018.

WILLIAMS, J.D. Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. **Int J Antimicrob Agents**, Netherlands, v. 12, suppl 1, p. S3-S7, 1999. DOI: 10.1016/s0924-8579(99)00085-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857999000850>. Acesso em: 18 mar. 2018.

WINN JUNIOR, W. *et al.* **Koneman Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WINOKUR, P.L. *et al.* Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clin Infect Dis**, Illinois, v. 32, suppl 2, p. S94-S103, 2001. DOI: 10.1086/320182. Disponível em: https://academic.oup.com/cid/article/32/Supplement_2/S94/276492. Acesso em: 14 mar. 2018.

WRIGHT, K.J.; SEED, P.C.; HULTGREN, S.J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. **Cell Microbiol**, India, v. 9, n. 9, p. 2230-2241, 2007. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00952.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2007.00952.x>. Acesso em: 28 jun. 2018.

WURPEL, D.J. *et al.* Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells. **J Proteomics**, Amsterdam, v. 131, p. 177-189, 2016. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.11.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187439191530172X>. Acesso em: 20 dez. 2017.

YAMAMOTO, S. *et al.* Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol Med Microbiol**, England, v. 12, n. 2, p. 85-90, 1995. DOI: 10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article/12/2/85/470515>. Acesso em: 27 ago. 2018.

YAMAMOTO, S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. **J Infect Chemother**, Netherlands, v. 13, n. 2, p. 68-73, 2007. DOI: 10.1007/s10156-007-0506-y. Disponível em: [https://www.jiac-j.com/article/S1341-321X\(07\)70869-3/pdf](https://www.jiac-j.com/article/S1341-321X(07)70869-3/pdf). Acesso em: 17 fev. 2018.

YASUMURA, Y; KAWAKITA, A. Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer research "in vitro." **Nihon Rinsho**, Osaka, v. 21, n. 6, p. 1201-1219, 1963.

Disponível em: https://mp.medicalonline.jp/products/detail.php?content_kind=0&content_detail_key=ag6niria%2F1963%2F002106%2F022%2F1201-1219. Acesso em: 15 set. 2018.

YONG, D. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009. DOI: 10.1128/AAC.00774-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00774-09>. Acesso em: 15 mar. 2018.

YUN, W.K. *et al.* Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. **J Microbiol Immunol Infect**, England, v. 47, n. 6, p. 455-461, 2014. DOI: 10.1016/j.jmii.2013.07.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118213001266>. Acesso em: 14 ago. 2018.

ZHANG, H. *et al.* Update of incidence and antimicrobial susceptibility trends of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Chinese intra-abdominal infection patients. **BMC Infect Dis**, London, v. 17, n. 1, 776, 2017. DOI: 10.1186/s12879-017-2873-z. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2873-z>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ZHENG, S.Q. *et al.* MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. **Nat Methods**, New York, v. 14, n. 4, p. 331-332, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4193. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.4193>. Acesso em: 10 maio 2018.