



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Nathália Lucas da Silva Andrade

Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* associadas à endocardite infecciosa no Rio de Janeiro, Brasil

Rio de Janeiro

2019

Nathália Lucas da Silva Andrade

Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* associadas à endocardite infecciosa no Rio de Janeiro, Brasil

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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

2019

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

A554 Andrade, Nathália Lucas da Silva.
 Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* associadas à endocardite infecciosa no Rio de Janeiro, Brasil / Nathália Lucas da Silva Andrade. – 2019.
 64 f.

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

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

1. Endocardite bacteriana – Etiologia – Teses. 2. *Escherichia coli* – Genética – Teses. 3. *Klebsiella pneumoniae* – Genética – Teses. 4. Infecções por bactérias Gram-Negativas – Diagnóstico – Teses. 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: 579.84(815.3)

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Nathália Lucas da Silva Andrade

Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* associadas à endocardite infecciosa no Rio de Janeiro, Brasil

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

Aprovada em 02 de maio de 2019.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

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

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Angela Correa de Freitas
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Cláudio Querido Fortes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, e a todos que acompanharam minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele nada seria possível.

À minha família, principalmente aos meus pais, por todo o suporte ao longo desse caminho.

À professora Prof^a. Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio e ao Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco, por terem me orientado.

À Ana Carolina da Cruz Campos por ter colaborado na realização desse projeto. Aos colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro. O financiamento público de pesquisas e o incentivo à qualificação profissional são fundamentais para o desenvolvimento do país.

RESUMO

ANDRADE, N. L. S. **Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* associadas à endocardite infecciosa.** 2019. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Endocardite Infecciosa (EI) é uma doença causada por microrganismos que acomete o tecido cardíaco, especificamente as valvas nativas mitral, tricúspide e aorta, tendo como alvos importantes valvas protéticas e dispositivos cardíacos eletrônicos como marcapassos e desfibriladores. EI apresenta altas taxas de mortalidade e morbidade podendo variar entre 30% a 71%. A ocorrência de endocardite por gram-positivos é mais frequente, sendo a espécie *Staphylococcus aureus* o principal agente etiológico. No entanto, tem sido observado outros patógenos associados a esse tipo de infecção, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. O objetivo do estudo foi caracterizar os aspectos moleculares e fenotípicos em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de dois pacientes com endocardite infecciosa, oriundos do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e hospital da rede pública Ordem Terceira do Carmo, respectivamente. Como metodologia molecular foi realizado o sequenciamento total do genoma (WGS) e o gMLST. A caracterização fenotípica foi realizada por análise da formação de biofilme qualitativo em superfície de vidro e biofilme semi-quantitativo em superfície de poliestireno. A capacidade de interação com células eucarióticas foi avaliada por testes de aderência em linhagens celulares Vero e HEp-2. Do sequenciamento genômico foi possível observar a presença de genes de resistência, *strA*, *aadA5*, *strB*, *sul1*, *sul2*, *drfA17*, *blaTEM-1B* e *fosA* para *E. coli*. Os genes *oqxA*, *oqxB*, e *blaSHV-1* foram identificados em *K. pneumoniae*. A cepa *E. coli* apresentou perfil fenotípico de resistência a Trimetropim, Trimetropim/Sulfametoxazol e Ampicilina, e as cepas de *K. pneumoniae* foram resistentes a Ampicilina, Fosfomicina e Nitrofurantoina. Quanto aos genes relacionados aos fatores de virulência, a cepa de *E. coli* apresentou os genes *iutA*, *allS*, *fimH*, *OmpA* e *irp2* e as cepas *K. pneumoniae* apresentaram os genes *mrkD*, *urea*, *uge*, *pgaC*, *fimC*, *OmpA* e *hgpA*. A técnica gMLST mostrou que a cepa *E. coli* pertenceu ao grupo ST 69 e a *K. pneumoniae* pertenceu ao grupo ST 76. Quanto aos testes fenotípicos, a cepa *E. coli* mostrou forte formação de biofilme enquanto que todas as cepas de *K. pneumoniae* mostraram formação de biofilme moderado. Todas as cepas apresentaram capacidade em aderir às linhagens celular Vero e HEp-2. Foi concluído que as cepas associadas á endocardite infecciosa utilizadas no estudo não apresentaram genes associados a clones hipervirulentos. No entanto, estas cepas foram capazes de aderir à linhagens celulares de origens diversas ressaltando o potencial de interação com células epiteliais e a habilidade de formação de biofilme como etapas importantes do mecanismo de patogênese para EI causada por *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Palavras-chave: endocardite infecciosa; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*;
sequenciamento genômico; biofilme; aderência.

ABSTRACT

ANDRADE, N. L. S. *Phenotypic and molecular characterization of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae triggering infective endocarditis*. 2019. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Infective Endocarditis (IE) is a disease caused by microorganisms that affects the heart tissue, specifically in the mitral, tricuspid and aorta native valves, but mainly prosthetic valves and electronic cardiac devices such as pacemakers and defibrillators. Endocarditis is an infection that presents high rates of mortality and morbidity with rate varies between 30% and 71%. Occurrence of Endocarditis by gram-positive is more frequent and *Staphylococci aureus* is the main etiological agent involved in the development of infection. However, IE by gram-negative bacilli has been observed, such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The aim of this study was to characterize molecularly and phenotypically *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains associated with IE isolated of two patients from hospitals in Rio de Janeiro, from the University Hospital Pedro Ernesto (HUPE) and Hospital of the public network Order Terceira do Carmo, respectively. As a molecular methodology, total genome sequencing (WGS) and gMLST were utilized. For phenotypic tests, qualitative biofilm formation in glass slides, quantitative biofilm formation in polystyrene surface and adherence in Vero (renal cells) and HEp-2 (larynx carcinoma) cell lines were performed. Phenotypic tests were realized for detection of antibiotic resistance. From sequencing it was possible to observe the presence of resistance genes in the strain of *E. coli* for *strA*, *Aada5*, *strB*, *Sul1*, *Sul2* and *drfA17* genes. *K. pneumoniae* strains presented the genes of resistance to *fosA*, *oqxA*, *oqxB*, *blaTEM-1B* and *blaSHV-1*. Resistance profile observed for *E. coli* was Trimetropim, Trimetropim/Sulfamethoxazole and Ampicillin, and all *K. pneumoniae* strains were resistant to Ampicillin, Phosphomycin and Nitrofurantoin. *E. coli* strain has genes *iutA*, *allS*, *fimH*, *OmpA* and *Irp2* and all *K. pneumoniae* strains have the genes *mrkD*, *urea*, *uge*, *pgaC*, *fimC*, *OmpA* and *hgpA*. gMLST showed that the strain *E. coli* belongs to the group ST 69 and *K.pneumoniae* belongs to the group ST 76. As for the phenotypic tests, the *E.coli* strain showed a strong biofilm formation while *K. pneumoniae* strains showed moderate biofilm formation in both surfaces. All strains were able to adhere to Vero and HEp-2 cell lines. We can conclude that the strains don't possess hypervirulent genes, but they are apt to form biofilm and interact with eukaryotic cells of different lineages. The results highlighting important mechanisms of pathogenesis that could help in the understanding of IE caused by *E. coli* and *K. pneumoniae*.

Keywords: infective endocarditis; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; genomic sequence; biofilm; adherence;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Biofilme da cepa <i>Escherichia coli</i> 7785 associada á EI, após 18h de incubação à 37°C	35
Figura 2 –	Biofilme de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> associadas á EI após 18h de incubação à 37°C	36
Figura 3 –	Biofilme de cepas controles EAEC 042 e UPEC I64 após 18h de incubação à 37°C	37
Figura 4 –	Aderência de <i>Escherichia coli</i> 7785 em células Vero	38
Figura 5 –	Aderência de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4 em células Vero	39
Figura 6 –	Aderência de cepas controle EAEC 042 e UPEC I64 em células Vero	40
Figura 7 –	Aderência de <i>Escherichia coli</i> 7785 em células HEp-2	41
Figura 8 –	Aderência de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4 em células Hep-2	42
Figura 9 –	Aderência de cepas controle EAEC 042 e UPEC I64 em células HEp-2.....	43
Figura 10 –	cgMLST das cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos das cepas estudadas	45
Tabela 2	Genes de resistência das cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Análise estatística do teste de formação de biofilme semi-quantitativo em poliestireno após 18hrs à 37 °C	34
-------------	---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Características de cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> utilizadas no presente estudo.....	27
Quadro 2 –	Padrão de formação de biofilme das cepas associadas á EI após 18 hrs de incubação à 37°C.....	37
Quadro 3 –	Genes de virulência presentes nas amostras de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> identificados pelo sequenciamento.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	American Heart Association
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica em aves
BGN	Bacilos Gram Negativos
CAIE	Community Associated Infective Endocarditis
CEA	Antígeno carcinoembrionico
CGE	Center for Genomic Epidemiology
DAF	Fator Acelerador de Decaimento
DIMI	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
D-MEM	Dulbecco's Minimal Essential Médium
DNAe	DNA extracelular
DO ₅₇₀	Densidade Óptica 570
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EI	Endocardite Infecciosa
EMB	Eosina-azul de metileno
ENV	Endocardite de Valvas Nativas
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESBLs	Extended Spectrum Beta-Lactamases
EXPEC	<i>Escherichia coli</i> Extraintestinal
HACEK	<i>Haemophilus</i> , <i>Actinobacillus actinomycetem comitans</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Eikenella corrodens</i> e <i>Kingella</i>
HAIE	Healthcare Associated Infective Endocarditis
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ITU	Infecção do Trato Utinário
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella</i> Produtora de Carbapenemase
LB	Luria Broth
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Multi Drug Resistance
MEC	Matriz Extra Celular
MEM	Minimal Essential Medium

MLST	Multi Locus Sequence Type
NNHCA-IE	NonNosocomial Healthcare Associated Infective Endocarditis
PBS	Phosphate Buffer Saline
SFB	Soro Fetal Bovino
ST	Sequence Type
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UMCG	University Medical Center Groningen
Upla	Uroplaquina
WGS	Whole Genome Sequence

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Hrs	Horas
µg	Microgramas
µl	Microlitros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
M	Molar
%	Porcentaje

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	25
1.1	Objetivo geral	25
1.2	Objetivos específicos	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	Amostra bacteriana	26
2.2	Conservação de Estoques Bacterianos	26
2.3	Preparo dos cultivos bacterianos	27
2.3.1	Cultivos simples	27
2.3.2	Isolamento	28
2.4	Ensaio de Biofilme	28
2.4.1	Ensaio Biofilme Qualitativo	29
2.4.2	Ensaio Biofilme Semi-Quantitativo	29
2.5	Condições de cultivo e manutenção das linhagens celulares utilizadas.....	30
2.5.1	Linhagem Vero	30
2.5.2	Linhagem HEp-2	31
2.5.3	Linhagem celular utilizada	31
2.5.4	Preparo dos cultivos celulares para os testes de aderência	31
2.5.5	Ensaio de aderência qualitativo com células Vero	32
2.5.6	Ensaio de aderência qualitativo com células HEp-2.....	32
2.6	Extração de DNA e sequenciamento	32
2.7	Análise dos dados	33
3	RESULTADOS	34
3.1	Biofilme Semi-Quantitativo	34
3.2	Biofilme Qualitativo das amostras clínicas de Enterobactereaceae	35
3.3	Aderência em linhagem celular Vero das amostras clínicas de Enterobactereaceae.....	38
3.4	Aderência em linhagem celular HEp-2 das amostras clínicas de	

	Enterobactereaceae	40
3.5	Sequenciamento e cgMLST	43
3.6	Perfil de resistência fenotípico	44
3.7	Análise molecular dos genes de resistência	45
3.8	Análise molecular dos genes de virulência	46
4	DISCUSSÃO	47
	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIA	53

INTRODUÇÃO

Endocardite Infecciosa

Endocardite infecciosa (EI) é uma infecção que acomete valva nativa, valva protética e dispositivos cardíacos eletrônicos implantados, como marca passo ou desfibrilador (KLEIN M.; WANG A. 2016). EI é considerada uma doença de alta morbidade (YANG F. et al, 2015) e com elevada taxa de mortalidade (20%-40%) (FARAJI R. et al 2018), surgindo de 3-10 novos casos em 100,000 habitantes por ano. Estudos epidemiológicos sugerem que a incidência de casos vem aumentando (PANTS S. et al, 2015, BOR D. H. et al 2013, FEDERSPIEL J.J. et al. 2012 e DAYER M. J. et al, 2015).

A doença se desenvolve em três estágios. O primeiro estágio se inicia através da entrada da bactéria via trato oral, intestinal ou urinário no sangue, caracterizando bacteremia. O acesso também pode se dar pela pele, por meio de cateter venoso, procedimento médico ou cirúrgico invasivo. O segundo estágio é a adesão, onde bactérias (principalmente espécies Gram positivas com excessão de *Staphilococcus aureus*) são capazes de aderir ao tecido endotelial, anormal ou injuriado, por meio de proteínas chamadas adesinas, presentes na superfície bacteriana. Essas proteínas especializadas medeiam a fixação às proteínas da matriz extracelular através de fibrinas e plaquetas (TSAI K. et al., 2009). Após a adesão bacteriana ocorre a colonização, onde em cada ciclo de proliferação ocorre a formação de vegetação madura no tecido cardíaco, além de trombose, recrutamento de monócitos e inflamação (HOBOT J. A. et al., 2001). Muitos microrganismos associados à EI, incluindo Estafilococos, Estreptococos, Enterococos e, em menor frequência, *Candida* e *Pseudomonas aeruginosa*, produzem vegetação com estrutura de biofilmes que permitem o estabelecimento de uma população microbiana no interior de matriz extracelular tipo slime, com ativação do sistema quorum-sense (interação célula-célula) e modulação da expressão gênica promovendo montagem ampliação e maturação da vegetação. Uma vez estabelecido, o biofilme protege a bactéria do sistema imune do hospedeiro, impedindo a eficácia antimicrobiana e seleciona microrganismos resistentes a antimicrobianos (EDEN C. S., HANSSON H. A. 1978). Fragmentos da vegetação podem se soltar e migrar para outras regiões do corpo (FAYYAZ, et al 2014). Diante de todas essas características, o biofilme é reconhecido como um importante determinante de virulência no desenvolvimento de infecções em associação com dispositivos (CLEGG S., OLD D.C. 1979).

Na era pré-antibiótica, EI afetava principalmente adultos jovens e indivíduos de meia idade que apresentavam principalmente doenças reumática do coração e doenças cardíacas congênitas (SECKELER M.D. et al 2011). Contudo, com o desenvolvimento dos antibióticos, declínio das doenças reumáticas e avanços na medicina durante o século XX, ocorreram mudanças no perfil dos fatores de risco, na microbiologia das EI, assim como nas características demográficas dos pacientes. Posteriormente outras comorbidades como degeneração das valvas cardíacas, hemodiálise, uso de valvas protéticas, imunodepressão, diabetes mellitus e uso de drogas intravenosas são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de EI (SLIPCZUK L. et al, 2013).

EI associada à assistência a saúde (HAIE – Healthcare Associated Infective Endocardite) é uma categoria amplamente reconhecida e estudos mostraram que mais de 30% dos casos de HAIE foram adquiridos em hospitais nos países desenvolvidos (HIDALGO N.F. et al 2008 e DAVILA P.M. et al 2005). Alguns fatores de risco estão associados ao desenvolvimento de HAIE, dentre eles: (1) aumento de procedimentos de diagnóstico e terapêuticos invasivos (HOEN B. et al., 2002), (2) cardiopatia degenerativa da valva, (3) complicações frequentes como insuficiência cardíaca, renale choque séptico e (4) infecções recorrentes com microrganismos virulentos e cepas multi-resistentes (TERPENNING M.S. et al., 1988). Porém, a magnitude desse problema mostrou que pacientes da comunidade em uso extensivo de procedimentos médicos invasivos também adquiriram EI (BENITO N. et al 2009 e GIANNITSIOTI P. et al 2007), dando origem a uma nova categoria, chamada EI associada a assistência a saúde não nosocomial (NNHCA-IE – NonNosocomial Healthcare Associated – Infective Endocardite).

Historicamente, a epidemiologia da EI apresenta três períodos evidentes: (1) EI era fatal antes da “era dos antibióticos”, (2) a introdução da penicilina como uso terapêutico nos anos 1940 diminuiu drasticamente o número de mortes. Entretanto a taxa de mortalidade não foi reduzida após o desenvolvimento das cirurgias cardíacas realizadas durante a fase ativa da infecção (WALLACE A.G. et al, 1965) e (3) ocorreu um aumento considerável de cirurgias na década passada, embora a terapia antimicrobiana tenha sido indispensável para salvar vidas e erradicar a infecção

(TLEYJEH I.M. et al, 2007 e THUNY F., HABIB G. 2010). No entanto, alguns estudos demonstram que a identificação apropriada de pacientes de alto risco e a rápida intervenção cirúrgica parece ser crucial para melhorar o prognóstico em casos graves de EI (BOTELHO N. E. et al, 2009). Com isso, o desafio no tratamento desta doença inclui melhorias nas estratégias de diagnóstico a fim de acelerar o início do tratamento, eficácia na

identificação de pacientes que requerem monitoramento e urgência cirúrgica bem como o desenvolvimento de novos métodos cirúrgicos e terapêuticos (THUNY F et al, 2012).

O diagnóstico dessa desordem é baseado no critério de Duke (Duke Criteria) (KIM M.S. et al, 2017), onde estão incluídos a análise clínica, exames laboratoriais como hemocultura, exames de imagem e ecocardiografia. O principal padrão deste critério é a identificação da vegetação nas valvas cardíacas pela ecocardiografia, o que geralmente ocorre entre 50-94% dos casos (LANG S. et al 2004) e o crescimento bacteriano na hemocultura, considerado padrão ouro (BOSSHARD P.P. et al, 2003). Somente 2,5%-31% dos casos de EI apresentam cultura negativa, o que pode ser atribuído ao tratamento antibiótico antes da coleta (LE GUERN R. et al, 2015), baixo crescimento microbiano (EL-KHOLY A.A. et al, 2015), fungos e/ou microrganismos intracelulares (BLUMENTAL S. et al, 2011).

De acordo com alguns estudos, os principais microrganismos envolvidos na etiologia de EI são Estafilococos, Streptococos e Enterococos. A identificação etiológica de patógenos como causa de EI é importante na terapia antimicrobiana adequada. *Staphylococcus aureus* associado á EI em valvas prostéticas apresenta o maior índice de mortalidade observada nesse tipo de infecção bacteriana (WANG A. et al, 2007 e SY R.W. et al, 2011). Todavia, pacientes com EI em valvas cardíacas causadas por *Staphylococcus* coagulase negativo apresentam complicações cardíacas significantes quando comparados as causadas por *Staphylococcus aureus* (KARCHMER A.W., ARCHER G.L., DISMUKES W.E., 1983 e LALANI T. et al,

2006). Essa gravidade se dá pela típica resistência á antibióticos, por parte dos *Staphylococcus* coagulase negativa. Estudos mostraram que a taxa de resistência a meticilina entre amostras clínicas de *Staphylococcus* coagulase negativo vem crescendo (CRUM N.F., et al, 2006, KLEVENS R.M., et al, 2007, e SCHRAM G.E., et al, 2007). Dentro do gênero dos Streptococos, *Streptococcus viridans*, um grupo heterogêneo alfa hemolítico, é responsável por 40-60% dos casos de EI em valvas nativas provenientes de procedimentos dentários na cavidade oral levando ao aumento da bacteremia e consequente infecção. A bacteremia é causada a partir de infecções na cavidade oral levando ao estabelecimento de EI (VICTORIA B. et al, 2018). Os Enterococos formalmente classificados como parte do grupo D dos Enterococos, são microrganismos comensais que habitam o intestino de humanos e outros mamíferos. *Enterococcus faecalis* é o terceiro agente etiológico mais frequente responsável por EI. Por fazer parte da flora do intestino, o microrganismo consegue entrar na mucosa lesionada e causar infecção (KHAN Z. et al, 2018).

EI por microrganismos gram-negativos não é frequente. No entanto, como agentes etiológicos desse tipo de infecção, estão associados a elevadas taxas de morbidade e mortalidade. EI por gram-negativos são classificados em duas principais categorias: HACEK (espécies *Haemophilus*, *Actinobacillus actinomycetem comitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e espécie *Kingella*) e bacilos Gram-negativos não-HACEK (formados pelas espécies de *Pseudomonas* e membros da família das Enterobacteraceae) (SANIA S. R.; OMER W. S.; MUHAMMAD R. L. 2010). Enquanto a incidência de EI por HACEK se mantém relativamente a mesma (REYES M.P.; REYES K.C., 2008), dados demonstram aumento significativo na epidemiologia da EI por gram-negativos não-HACEK (LAMPE A.S.; SCHROIJEN M.A.; SMITH S.J., 2008 e MORPETH S., et al 2007).

Dentro do grupo HACEK, as espécies do gênero *Haemophilus* (*Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus* e *Haemophilus paraphrophilus*) são os principais responsáveis pelos casos de EI, tendo *Eikenella corrodens* também como um dos agentes com elevada importância. As espécies do grupo HACEK compartilham fatores de risco para EI, particularmente atribuídos a higiene bucal inadequada e procedimentos dentários que permitem o patógeno ganhar o compartimento vascular no local do trauma ou infecção estabelecida (DAS M., et al 1997). Valvulopatias pré-existentes também são bem reconhecidas como fator para EI por HACEK, pois a cardiopatia permite a aderência bacteriana no epitélio endotelial. Revisões bibliográficas demonstraram haver similaridade nos fatores de risco na maioria dos casos de EI por HACEK, incluindo infecções bucais após tratamento dentário, infecção respiratória alta e doença cardíaca degenerativa (COHEN P.S.; MAGUIRE J.H.; WEINSTEIN L., 1980). O aumento da expectativa de vida e da população idosa pode resultar no surgimento de novos casos de doenças degenerativas das valvas e cirurgias para implante de valvas protéticas, aumentando e levando esses pacientes a probabilidade de desenvolver EI (MYLONAKIS E.; CALDERWOOD S.B., 2001). Antibióticos beta-lactâmicos como penicilinas ou ampicilinas, com ou sem adição de aminoglicosídeos, era considerada droga de escolha para EI por HACEK. No entanto, com o aumento de patógenos do grupo HACEK produtores de beta-lactamase (BADDOUR L.M. et al, 2005 e DALL L. et al, 1987) a Associação Americana do Coração – AHA (American Heart Association), passou a recomendar o tratamento empírico com cefalosporina de terceira geração, como ceftriaxona ou ampicilina-sulbactam, como primeira linha de terapia para EI por HACEK (BADDOUR L. M. et al, 2005). Opções alternativas de tratamento incluem o uso de fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, em pacientes alérgicos à cefalosporina e ampicilina (SANIA S. R.; OMER W. S.; MUHAMMAD R. L. 2010).

Embora bacteremia por *Escherichia coli* (*E. coli*) seja comum, EI por bacilos Gram-negativos não-HACEK são raros (REYES M.P.; REYES K.C., 2008). Estudos observaram aumento na incidência de EI por espécies dessa categoria, principalmente infecções por *E. coli* (29%) e *Pseudomonas aeruginosa* (22%) (SANIA S. R.; OMER

W. S.; MUHAMMAD R. L. 2010). EI por *E. coli* frequentemente se apresenta concomitante com outra infecção, incluindo infecção do trato urinário (BRANGER S. et al, 2005 e MICOL R. et al, 2006). Apesar de estar associada à assistência a saúde, o desenvolvimento de EI por *E. coli* pode ser atribuída a susceptibilidade aos antibióticos. Em alguns casos de EI associada a *E. coli* reportados na literatura, a infecção envolvia microrganismos resistentes a beta-lactâmicos de espectro estendido (extended spectrum beta-lactamases - ESBLs) (CHUNG-JONG K. et al, 2017). As cepas ESBLs conferem resistência à terceira e quarta geração de cefalosporina e monobactâmicos e co-resistência a fluoroquinolonas, tetraciclina e aminoglicosídeos. Diante desse cenário, os carbapenêmicos são a droga de escolha na terapia contra enterobactérias produtoras de ESBL (LIVERMORE D. M. et al, 2006).

Mais de 95% dos casos de EI associada a *E. coli* estão relacionados ao uso de droga recreativa (BADDOUR L.M. et al, 2005). Entretanto outros fatores de risco também estão atribuídos ao desenvolvimento da doença como cirrose hepática (TSUTSUMI T. et al, 2010), implante de valvas protéticas, idade, gênero, diabetes mellitus, infecção do trato urinário (ITU), hospitalização prolongada e uso prévio de cefalosporinas, quinolonas e outros antimicrobianos (MORPETH S. et al, 2007), consequentemente contribuindo para a alta taxa de abscesso intracardiaco, sepse e mortalidade (BRANGER S. et al, 2005). Além da presença de vegetação em valvas protéticas, foi observado que a ocorrência de EI por *E. coli* em valvas nativas (ENV Valvas Nativas) (MICOL R. et al, 2006), principalmente em pacientes idosos, têm aumentado (BOUZA E. et al, 2001). O aumento na frequência de IE associada a *E. coli* em idosos pode ser explicado pela mudança da mucosa vaginal em mulheres e diabetes mellitus, onde ambos podem levar ao aumento do risco de ITU (MICOL R. et al, 2006). Outros fatores como terapia imunossupressiva e câncer podem aumentar as chances de bacteremia em pacientes com ITU, sendo a *E. coli* a mais comum causa de bacteremia por Gram-negativo. Entre os casos confirmados de ENV por *E. coli*, a incidência foi de 72% em mulheres, mesmo EI sendo mais freqüente em homens idosos (DHAWAN V. K. et al, 2002). Russo e Johnson propuseram uma nova designação para um grupo de cepas de *E. coli* capazes de causar infecções extra- intestinais associadas á fatores de virulências (RUSSO T. A., JOHNSON J. R. 2000). As cepas de ExPEC são hoje conhecidas por pertencerem ao grupo

filogenético B2 e ao grupo D, assim como as cepas comensais que pertencem aos grupos A e B1 (JOHNSON J. R. et al, 2002). Além disso, ExPEC possui fatores de virulência que lhe permite aderir, invadir e escapar da resposta imune (BINGEN-BIDOIS M. et al 2002) e adquirir nutrientes essenciais como ferro (JOHNSON J. R. et al, 2002). Desta forma, algumas cepas de EI associada á *E. coli* exibiram características típicas de ExPEC e de cepas semelhantes responsáveis por urosepse (BINGEN-BIDOIS M. et al 2002).

Infecções e colonizações causadas por *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) produtora de Carbapenemases (KPC) representam um grande desafio para saúde pública (DOI Y.; PATERSON D. L. et al, 2015). *K. pneumoniae* é um agente etiológico raro causador de EI. Entretanto EI associada á *K. pneumoniae* é extremamente perigosa, apresentando uma mortalidade de 49% (SRINIVAS K. H. et al, 2013). EI associada á *K. pneumoniae* pode afetar tanto as valvas nativas como as valvas protéticas, tendo uma incidência de 1,2% em valvas nativas e 4,1% em valvas protéticas. As valvas mais afetadas pela *K. pneumoniae* são as valvas aórtica, seguidas pelas valvas mitral e tricúspide (ANDERSON M. J. et al, 1998). O desenvolvimento de grande vegetação, perfuração da valva e abscesso intracardiaco são as complicações mais frequentes em pacientes com EI (SRINIVAS K. H. et al, 2013). Hospitalização é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de EI associada á *K. pneumoniae*, assim como uso prévio ou prolongado de agentes antimicrobianos (YONG M. S. et al 2016). O tratamento da infecção é conduzido pelo uso de agentes antibióticos geralmente associado a procedimento cirurgico para remoção da vegetação nas valvas (SATLIN M. J. et al 2014).

As cepas KPCs têm a capacidade de hidrolizar eficientemente todas as cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e até inibidores de β -lactamases, reduzindo as opções efetivas de tratamento das bacteremias (AKOVA M. et al 2012 e CARMELI Y. et al 2010). Diante disso, é amplamente aceito o uso combinado de antibiótico de primeira geração, principalmente carbapenemases com os de segunda geração como colistina, tigeciclina, gentamicina, fosfomicina, sendo essa a forma mais adequada de tratamento contra infecção (SATLIN M. J. et al 2014). Em EI na valva tricúspide é indicada cirurgia para reconstrução (YONG M. S. et al 2016).

Biofilme

Biofilme é uma comunidade microbiana formada por uma ou diversas espécies cercadas por uma matriz extracelular (MEC) (NANI V.G. et al 2018) composta por DNA

extracelular (DNAe), polissacarídeos, lipídeos e proteínas. Enzimas também estão presentes na MEC atuando como um sistema digestivo do biofilme (FLEMMING H. C.; WINGENDER J. 2010). Dentre as proteínas presentes na MEC, existem proteínas estruturais amiloides (SERRA D. O.; RICHTER A. M.; HENGGE R. 2013), chamadas Curli, que participam da constituição do biofilme (MCCRATE O. A. et al 2013). Os biofilmes podem ser formados sobre diversas superfícies naturais, em dispositivos médicos e industriais (O'TOOLE G.; KAPLAN H. B.; KOLTER R. et al 2000). Curli pode ser expressada em espécie comensal de *E. coli*, assim como em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* patogênica em aves (APEC) e isolados causadores de sepse (NANI V.G. et al, 2018). Curli é secretada pelo sistema de secreção do tipo VII. Suas fibras são codificadas pelos operons *csgDEFG* e *csgBAC* que por sua vez codificam as sub-unidades CsgA e CsgB secretadas para região externa da membrana. CsgB em associação com a região externa da membrana bacteriana fornece instrumentos que estimulam CsgA a adotar uma prega amiloide e assim formar as fibras (HUFNAGEL D. A.; DEPAS W.; CHAPMAN M. R. 2015).

A habilidade em formar biofilme é considerada como o principal atributo de virulência das espécies que formam o gênero das *E. coli*, pois o seu estabelecimento nas células do epitélio do hospedeiro é facilitado e sua erradicação fica prejudicada.

O desenvolvimento do biofilme ocorre com a sedimentação de células planctônicas em superfícies bióticas e abióticas, adesão e criação de um grupo de células bacterianas, estabelecendo uma colônia resistente a agentes antimicrobianos. A partir daí a estrutura tridimensional é renovada com a remoção de células individuais das colônias, fixação de novas células as superfícies e formação de novos aglomerados. As microcolônias são separadas por canais de filtração de água que fornecem nutrientes essenciais para o crescimento microbiano e remoção de produtos metabólicos gerados pelas bactérias. De acordo com Anderson & O'Toole (2008) e Stewart & Franklin (2008), a bactéria patogênica formadora de biofilme pode ser

1.000 vezes mais resistentes á agentes antimicrobianos, assim como a antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro (ZALEWSKA-PIŁATEKA, et al. 2013).

Uma grande variedade de fatores de virulência está envolvida na formação de biofilme como fimbrias P, hemolisinas, sistema de aquisição de ferro, lipopolissacarídeos (LPS) e cápsulas, onde os três principais fatores são fimbrias P, fimbrias tipo 1 (codificadas respectivamente pelos genes *pap* e *Fim*) e α - hemolisinas codificadas pelo gene *hlyA*, membro da família de toxinas RTX. A formação de biofilme nas células do trato urinário é

proporcionada pela Dr Hemaglutinina, uma adesina codificada pelos genes *dra*, que pode utilizar até quatro tipos de receptores para aderir ao epitélio renal do hospedeiro: DAF (Fator acelerador de decaimento), CEA (Antígeno carcinoembrionico), integrina $\alpha 1\beta 2$ e colágeno tipo IV (FATTAHI et al. 2015).

A capacidade de formação de biofilme por *K. pneumoniae*, como fator de virulência ainda não é bem clara (ZHENG J. X. et al., 2018). No entanto, infecções com cepas que apresentam a habilidade de formar biofilmes costumam ser mais difíceis de tratar (RIBEIRO S. M. et al., 2015), especialmente *K. pneumoniae* resistentes aos Carbapenêmicos, onde a formação de biofilme é óbvia (DIAGO-NAVARRO E. et al., 2014). O biofilme maduro confere às cepas *K. pneumoniae* resistência á antibióticos e capacidade de escapar de células fagocíticas do sistema imune, tornando sua eliminação mais difícil quando comparadas á cepas planctônicas (LEBEAUX D. et al., 2014). A maioria das cepas *K. pneumoniae* expressam duas adesinas fimbriais, fímbria tipo 1 e fímbria tipo 3 (PODSCHUN R.; ULLMANN U., 1998). A fímbria tipo 1 medeia a adesão á receptores de manose (KLEMM P.; SCHEMBRI P., 2000) e as fímbrias tipo 3 estão presentes em praticamente todas as cepas de *K. pneumoniae* medeando sua ligação á diversos tipo de células epiteliais *in vitro* (CASPER S. et al., 2010). Alguns estudos revelaram que cepas de *K. pneumoniae* oriundas de amostras de cateter urinário que expressaram fímbria tipo 3 formavam biofilme forte favorecendo o desenvolvimento de infecções associados ao uso de cateter (SCHROLL C. et al., 2010), assim como cepas isoladas de abscesso hepático piogênico que expressaram genes *treC* e *sugE* modulavam a produção de polissacarídeo capsular e facilitavam a colonização no trato gastrointestinal, indicando que a formação de biofilme contribui para o estabelecimento e persistência de infecções por *K. pneumoniae* (WU M.C. et al., 2011).

Aderência

A aderência é a primeira etapa da colonização e desenvolvimento da infecção pela bactéria no hospedeiro humano (SALDANA Z et al., 2014). A ligação entre bactérias e células é regulada por filamentos de adesinas, também conhecidas como fímbrias que se liga a receptores específicos presentes nas células do hospedeiro. As principais fímbrias que participam da interação bactéria-célula em ITU são as fímbrias tipo 1 e P (ANTÃO E. M. et al., 2009). A fímbria tipo 1 permite a UPEC se ligar ao epitélio da bexiga por meio de ligações em proteínas α -D-manose (TSAI K. W. et al. 2009) e as fímbrias P (pili associada a

pielonefrite) fazem a ligação através de receptor α -Gal(1–4) β -Gal presentes no epitélio renal (ROBERTS J. A. et al., 1994; TSAI K. W. et al., 2009).

No entanto, as fímbrias citadas acima não são as únicas adesinas envolvidas na aderência de UPEC ao epitélio renal e a bexiga. A adesina afímbrial AFA/Dr codificada pelo gene *afa* (JOHNSON J. R. e STELL A. L. 2000) e a fimbria F1C/S, codificada pelo gene *sfa* (ANTÃO E. M. et al., 2009) também atuam ligando UPEC às células do trato urinário humano. A adesina AFA/Dr se liga as proteínas de colágeno tipo IV presentes no epitélio renal, enquanto a fimbria F1C/S se liga a glicoproteínas sialil galactosídeo e a glicolipídeos GalNAc β 1-4Gal β ambos presentes nos epitélios renal e da bexiga (TSAI K. W. et al. 2009). A Uroplaquina (UPla), uma glicoproteína presente no epitélio da bexiga, também participa da interação célula-bactéria como receptor para FimH, promovendo a aderência à célula do hospedeiro e início da infecção por UPEC (KURIMURA Y. et al 2012).

Sequenciamento de genoma total

A técnica de sequenciamento de genoma total (WGS – Whole Genome Sequence) possui grande poder discriminatório quando comparado a outros métodos moleculares. Dados obtidos por WGS permitem a caracterização molecular de patógenos, incluindo a identificação de genes de virulência e de genes de resistência (ZHOU K. et al. 2014). O WGS também permite a identificação através de comparação genômica. Tais avanços facilitaram enormemente a investigação em diferentes níveis, traçando o perfil patogênico dos microrganismos, assim como sua transmissão entre pacientes (HARRIS S. R., et al. 2013). Essa metodologia permite definir e aperfeiçoar estratégias de controle das infecções. As características moleculares reveladas pelo WGS podem contribuir para o aperfeiçoamento do tratamento clínico, pois a detecção precisa de genes de resistência a antibióticos promove melhor orientação na terapia.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral investigar o perfil molecular e fenotípico de cepas de enterobactérias, *E. coli* e *K. pneumoniae*, oriundas de vegetação valvar de pacientes atendidos nos hospitais HUPE e Ordem terceira do Carmo, respectivamente.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos;
- b) Avaliar aspectos fenotípicos resultantes da formação de biofilme e da interação bactéria-célula em linhagens Vero (rins de macacos verdes africanos) e HEp-2 (carinoma de laringe humana);
- c) Identificar a presença de genes de resistência e genes de virulência nas cepas em estudo;
- d) Identificar o sorotipo e o grupo ST (Sequence Type) de cada cepa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras Bacterianas

Foram utilizados no presente estudo uma cepa de *E. coli* (DO7785) coletada de amostra de vegetação valvar tricúspide de paciente do sexo feminino e idosa com CAIE (Community Associated Infective Endocarditis) comunitária em tratamento interno no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). A cepa foi isolada no laboratório de bacteriologia do HUPE. As quatro cepas de *K. pneumoniae* (Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4) foram identificadas e isoladas de urinoculturas oriundas de paciente do sexo masculino com insuficiência renal e idoso com HAIE no laboratório de bacteriologia do Hospital da Ordem Terceira do Carmo (tabela 1). Todas as cepas foram encaminhadas para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DIMIP - UERJ).

2.2 Conservação dos estoques bacterianos

As cepas foram estocadas em tubos de plástico com rosca contendo 1mL de meio GC com glicerol 20% (v/v) e mantidas em temperatura de -20°C e -70°C. Alíquotas dos tubos do estoque mantido à temperatura de -20°C foram utilizadas para a realização dos testes e os tubos mantidos a -70°C constituíram o estoque permanente.

Quadro 1 – Características de cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* utilizadas no presente estudo.

Cepas	Espécies	Origem	Tipo de Infecção	Vegetação
DO 7785	<i>Escherichia coli</i>	HUPE	I_c	Valva tricúspide
Kp1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ordem terceira do Carmo	I_h	Valva tricúspide
Kp2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ordem terceira do Carmo	I_h	Valva tricúspide
Kp3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ordem terceira do Carmo	I_h	Valva tricúspide
Kp4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ordem terceira do Carmo	I_h	Valva tricúspide

Legenda: Ic: Infecção comunitária, Ih: Infecção hospitalar. Fonte: A autora, 2019.

2.3 Preparo dos cultivos bacterianos

2.3.1 Cultivos simples

As cepas foram inoculadas em 5µL de caldo Luria-Both (LB, Merck, S. A.) para os testes de formação de biofilme e aderência e incubadas em estufa a 37°C por um período de 18 hrs até atingirem a fase estacionária de crescimento (cerca de 2×10^9 células/mL).

2.3.2 Isolamento

Para confirmação das espécies, as cepas oriundas das amostras clínicas, *E. coli* e *K. pneumoniae*, foram semeadas em meio de isolamento, Ágar eosina-azul de metileno EMB (Becton e Dickson e companhia, Nova Jersey, EUA), por esgotamento com auxílio de alças bacteriológicas. As placas semeadas foram incubadas em estufa por 24 hrs à 37° C. Após a incubação foi realizada a leitura e interpretação da morfologia e aspectos das colônias.

A diferenciação ocorre em resposta à fermentação da lactose e/ou sacarose por microorganismos indicados pelos corantes. A interpretação das cepas se deu através da presença de colônias de cor preta azulada com reflexo verde metálico, indicando fermentação de lactose, onde se podem identificar presuntivamente as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae*. Em particular, as colônias da espécie *K. pneumoniae* apresentam um aspecto mucóide devido a presença de cápsula em sua estrutura celular, diferenciando-a das outras espécies de enterobactérias.

A confirmação da espécie foi realizada através de espectrometria de massa MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; Bruker, Germany). As amostras foram cultivadas em ágar MacConkey por 18 horas a 37°C. Aproximadamente 10 colônias isoladas de cada amostra foram lavadas duas vezes em 1mL água destilada estéril, ressuspensas em 1mL de etanol 70% e centrifugadas em 14.000 rpm por 2 minutos. O pellet foi seco a 37°C por 30 minutos e as células foram lisadas em 100µL de ácido fórmico 35% e acetonitrila 50%. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante usado para análise. Um microlitro de cada amostra foi aplicado à placa metálica, seca ao ar e 1µL da matriz (10mg/mL ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético) foi aplicada sobre cada amostra. As amostras foram submetidas à identificação no sistema automatizado de identificação microbiana BD[®] Bruker MALDI Biotyper[®] System, sendo a identificação microbiana conseguida através da obtenção do espectro analisando-o na base de dados Bruker MALDI Biotyper Library.

2.4 Ensaios de Biofilme

Os ensaios de biofilme qualitativo em vidro e semi-quantitativo em poliestireno foram realizados a fim de avaliar a habilidade das cepas em formar biofilme sobre superfícies abióticas.

2.4.1 Ensaio de Biofilme Qualitativo

As cepas de *E.coli* e *K.pneumoniae* inoculadas 5 μ L em meio LB e incubadas em estufa por 18 hrs á 37° C sob condições aeróbias. Após o tempo de incubação, as placas de 24 poços foram montadas com lamínulas estéreis de 13mm de espessura. Após adição de 1mL de meio Dulbecco's Minimal Essential Medium (D-MEM, Gibco-BRL), alíquotas de 10 μ L de cada cultura foram adicionadas aos orifícios e incubados em estufa por 18hrs à 37°C em aerobiose. Após o período de incubação, as lamínulas foram removidas e lavadas 3 vezes com PBS-D e, em seguida, fixadas com metanol por 15 minutos. Para coloração das lamínulas foi utilizado o corante cristal violeta (Laplast Labor) 0,5% por 5 minutos. As lamínulas foram lavadas com água destilada, secas, dispostas sobre lâmina de vidro com meio de inclusão rápida para microscopia (Entellan, Merck S.A., Rio de Janeiro) e em seguida foram observadas uma média de 20 campos por lâmina em microscópio óptico (Nikon) (SHEIKH J et al., 2001).

2.4.2 Ensaio Biofilme Semi-Quantitativo

A capacidade de formação de biofilme foi testada conforme a metodologia descrita por Sheikh J et al. (2001), com adaptações. Foram transferidos 5 μ L de cada cultura para 200 μ L e DMEM, previamente distribuídos em cada orifício de um placa estéril de poliestireno com 96 poços (Costar, NY, USA). Após a incubação da placa por 18 horas a 37°C, o meio foi removido e descartado, os poços foram lavados duas vezes com 200 μ L de PBS, secos na temperatura ambiente, fixados com 200 μ L de metanol por 20 minutos e corados com 200 μ L de cristal violeta a 2% (utilizado para a coloração de Gram), por 15 minutos. Os poços foram lavados novamente com água destilada estéril, por duas vezes, e em seguida foram adicionados 200 μ L de metanol por 30 minutos para solubilização do corante impregnado no biofilme. Foram transferidos 150 μ L dessa solução para outra placa de 96 poços. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada por espectrofotômetro de microplacas (Epoch), a 570 nm. Ostestes foram realizados três vezes em triplicata e controles

apropriados foram incluídos, para o controle negativo os poços não foram inoculados. As médias obtidas de cada cepa foram comparadas estatisticamente com o controle positivo EAEC 042 e com o controle negativo.

De acordo com os critérios de Stepanovic et al. (2007), as amostras foram classificadas em categorias com base na densidade óptica (DO): não formadora de biofilme – DO obtida menor que a DOc (média do controle negativo + 3x seu desvio padrão); biofilme fraco – $DOc < DO \leq (2x DOc)$; biofilme moderado – $(2x) DOc < DO \leq (4x DOc)$ e biofilme forte – $DO > (4x DOc)$. Os testes foram realizados por três vezes em triplicata. Os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad-Prism versão 8.0.2 e para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de comparação múltipla Bonferroni, sendo $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo.

2.5 Condições de cultivo e manutenção das linhagens celulares utilizadas

2.5.1 Linhagem Vero

A linhagem celular Vero (ATCC CCL-81, originária de rim de macaco verde africano) foi cultivada em frascos plásticos com faces planas (LabTek, Nunc Int., Rochester, NY, USA), contendo 5 mL de meio de cultura MEM (MinimalEssentialMedium, Gibco-BRL) suplementado com gentamicina 50 µg/mL, fungizona 2,5 µg/mL e 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco- BRL). As células foram mantidas em estufa, a 37°C, em atmosfera acrescida de 5% de CO₂ (37°C/CO₂), por cerca de 2 a 3 dias, até atingir a confluência. O sub-cultivo foi realizado a cada 2-3 dias.

Para o sub-cultivo das células, os tapetes foram recobertos com solução de tripsina-EDTA (tripsina 0,2%; EDTA 0,02% em PBS 0,01M, pH 7,2) (Bird e Forrester, 1981). Após a remoção da solução, as células foram desprendidas da superfície lisa por pipetagem com meio de cultura completo. A suspensão resultante foi então dividida em dois novos frascos, que foram incubados a 37°C/CO₂ até a confluência dos tapetes celulares (ROSA, A. C. P. I. et al., 1998).

2.5.2 Linhagem HEp-2

A linhagem celular HEp-2 (ATTC CCL23 originária de carcinoma de laringe humana) foi cultivada em frascos plásticos com faces planas (LabTek, Nunc Int., Rochester, NY, USA), contendo 5mL de meio de cultura MEM (MinimalEssentialMedium, Gibco-BRL) suplementado com gentamicina 50 µg/mL, fungizona 2,5 µg/mL e 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-BRL). As células foram mantidas em estufa, a 37°C, em atmosfera acrescida de 5% de CO₂ (37°C/CO₂), por cerca de 2 a 3 dias, até atingir a confluência. O sub-cultivo foi realizado a cada 2-3 dias.

Para o sub-cultivo das células, os tapetes foram recobertos com solução de tripsina-EDTA (tripsina 0,2%; EDTA 0,02% em PBS 0,01M, pH 7,2) (BIRD e FORRESTER, 1981). Após a remoção da solução, as células foram desprendidas da superfície lisa por pipetagem com meio de cultura completo. A suspensão resultante foi então dividida em dois novos frascos, que foram incubados a 37°C/CO₂ até a confluência dos tapetes celulares (ROSA, A. C. P. I. et al., 1998).

2.5.3 Linhagem celular utilizada

As linhagens celulares utilizadas no estudo foram Vero (ATCC CCL-81, originária de rim de macaco verde africano) e HEp-2 (ATTC CCL23 originária de carcinoma de laringe humana).

2.5.4 Preparo dos cultivos celulares para os testes de aderência

Para a realização do teste de aderência os cultivos celulares foram tripsinizados como descrito nos itens anteriores (itens 2.5.1 e 2.5.2) e as células foram distribuídas em placas de cultura de células de 24 orifícios (Costar, NY, USA) contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, previamente esterilizadas. Estas foram incubadas a 37°C/CO₂ até a confluência dos tapetes celulares, o que ocorre por volta de 2 a 3 dias de incubação (ROSA, A. C. P. I. et al., 1998).

2.5.5 Ensaio de aderência qualitativo com células Vero

Para a realização do teste de aderência com a linhagem celular Vero utilizamos o protocolo descrito por Rosa *et al.* (1998), com modificações. Após a confluência dos tapetes celulares, cada orifício foi lavado duas vezes com PBS-D e acrescido de 1mL de meio MEM com SFB 2%, na presença de D-manose 1%. Posteriormente, foram inoculados 35µL de cultura bacteriana, preparada conforme descrito no item 2.3.1, em cada orifício. A placa foi incubada por 3 horas a 37°C/CO₂. Após o período de co- incubação, as células Vero foram lavadas duas vezes com PBS-D e, em seguida, fixados com metanol por 15 minutos. Para coloração das células foi utilizado o corante de Giemsa (Merck S.A., Rio de Janeiro, 1:20, v/v) em tampão fosfato 0,03M (pH 6,5) por um período de 30 minutos. As lamínulas foram lavadas com água destilada, secas, dispostas sobre lâmina de vidro com meio de inclusão rápida para microscopia (Entellan, Merck S.A., Rio de Janeiro) e em seguida foram observadas em microscópio óptico (Nikon).

2.5.6 Ensaio de aderência qualitativo com células HEp-2

Para a realização do teste de aderência com a linhagem celular HEp-2 utilizamos o protocolo descrito por Rosa *et al.* (1998). Após a confluência dos tapetes celulares, cada orifício foi lavado duas vezes com PBS-D e acrescido de 1mL de meio MEM com SFB 2%, na presença de D-manose 1%. Posteriormente, foram inoculados 35µL de cultura bacteriana, preparada conforme descrito no item 2.3.1, em cada orifício. A placa foi incubada por 3 hrs a 37°C /CO₂. Após o período de co-incubação, as células HEp-2 foram lavadas duas vezes com PBS-D e, em seguida, fixados com metanol por 15 minutos. Para coloração das células foi utilizado o corante de Giemsa (Merck S.A., Rio de Janeiro, 1:20, v/v) em tampão fosfato 0,03M (pH 6,5) por um período de 30 minutos. As lamínulas foram lavadas com água destilada, secas, dispostas sobre lâmina de vidro com meio de inclusão rápida para microscopia (Entellan, Merck S.A., Rio de Janeiro) e em seguida foram observadas em microscópio óptico (Nikon).

2.6 **Extração de DNA e sequenciamento**

O DNA das bactérias foi extraído de cada isolado usando o kit de extração de DNA microbiano Ultraclean® (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, US) seguindo o protocolo do fabricante. Uma biblioteca de DNA foi preparada usando o NexteraXTkit (Illumina, SanDiego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e, em seguida o sequenciamento executado em um instrumento MiSeq (Illumina). Análise de dados foi realizada primeiramente com a montagem do arquivo. *De novo* assembly foi realizada com o CLC Genomics Workbench v7.0.3 (CLC bio A / S, Aarhus, Dinamarca). Após a análise de qualidade, a anotação foi executada ao carregar a sequencia na ferramenta online do RASTserver version 2.0. A identificação de genes de virulência, resistência assim como MLST e sorotipagem foram realizadas usando as ferramentas disponíveis no CGE (Center for genomic Epidemiology) (AZIZ R. K. et al., 2008). Os ensaios de sequenciamento foram realizados no Departamento de Microbiologia Médica da Universidade de Groningen, Holanda.

2.7 Análise dos dados

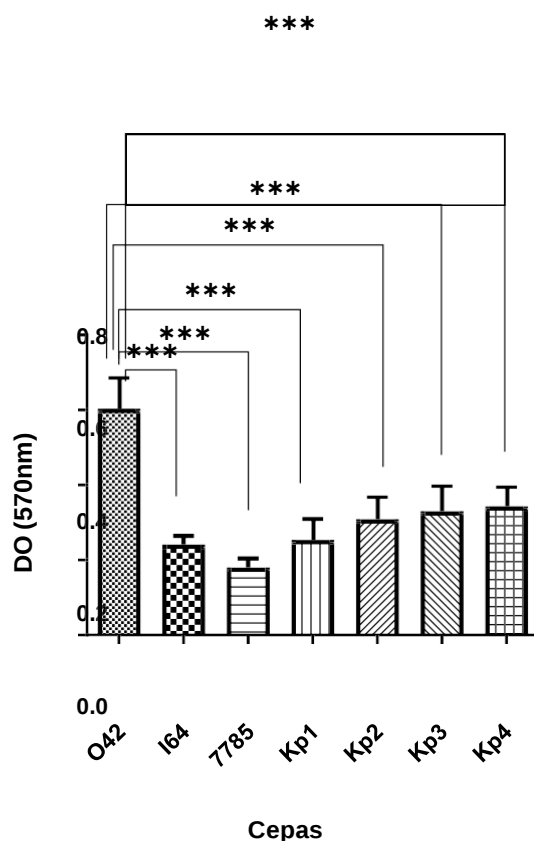
O grupo ST foi identificado através de comparação dos bancos de dados de genomas presente no site Center for Genomic Epidemiology (CGE) MLST (version 1.7) (LARSEN M. V. et al., 2012). A presença de genes de resistência a antibióticos foi determinado através de dados em formato fasta ResFinder 2.1 (ZANKARI E et al., 2012) do servidor CGE. A identificação dos genes de virulência e elementos móveis foi realizada usando blast com bancos com referência de dados de NCBI ou ENA através de ferramentas do CLC Genomics Workbench v10.0.1 (CLC bio A/S, Aarhus, Denmark). Os grupos filogenéticos foram determinados através SeqSphere v.4.1.9 (Ridom, Munster, Germany) e a tipagem genética foi determinada usando um 2358- genes core genômico (cg) MLST.

3. RESULTADOS

3.1 Biofilme Semi-Quantitativo

Analisando os dados através do teste de comparação múltipla Bonferroni, considera-se que um valor de p menor ou igual a 0.05 indica que há pelo menos uma diferença significativa entre os grupos comparados. O valor das médias das cepas foi comparado com controle positivo EAEC 042 em teste estatístico de comparação múltipla Bonferroni. Todas as médias apresentaram resultados de $p < 0,0001$.

Gráfico 1 - Análise estatística do teste de formação de biofilme semi-quantitativo em poliestireno após 18hrs à 37 °C.

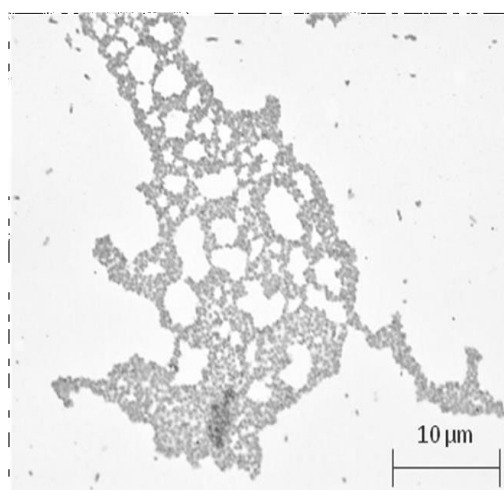


Legenda: 7785: *E. coli*; Kp: *Klebsiella pneumoniae*; cepas controles positivos: EAEC 042, UPEC I64. (***) $p < 0,0001$. Fonte: A autora, 2019.

3.2 Biofilme qualitativo das amostras clínicas de Enterobactereaceae

Após 18 horas de incubação, foi observada formação de biofilme forte em superfície de poliestireno pela cepa *E. coli* DO7785 (figura 1). As cepas de *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4 mostraram formação de biofilme moderado (figura 2). Todas as cepas foram comparadas com as cepas controles EAEC 042 e UPEC I64 (figura 3). O padrão de formação de biofilme das cepas está sumarizado no quadro 2.

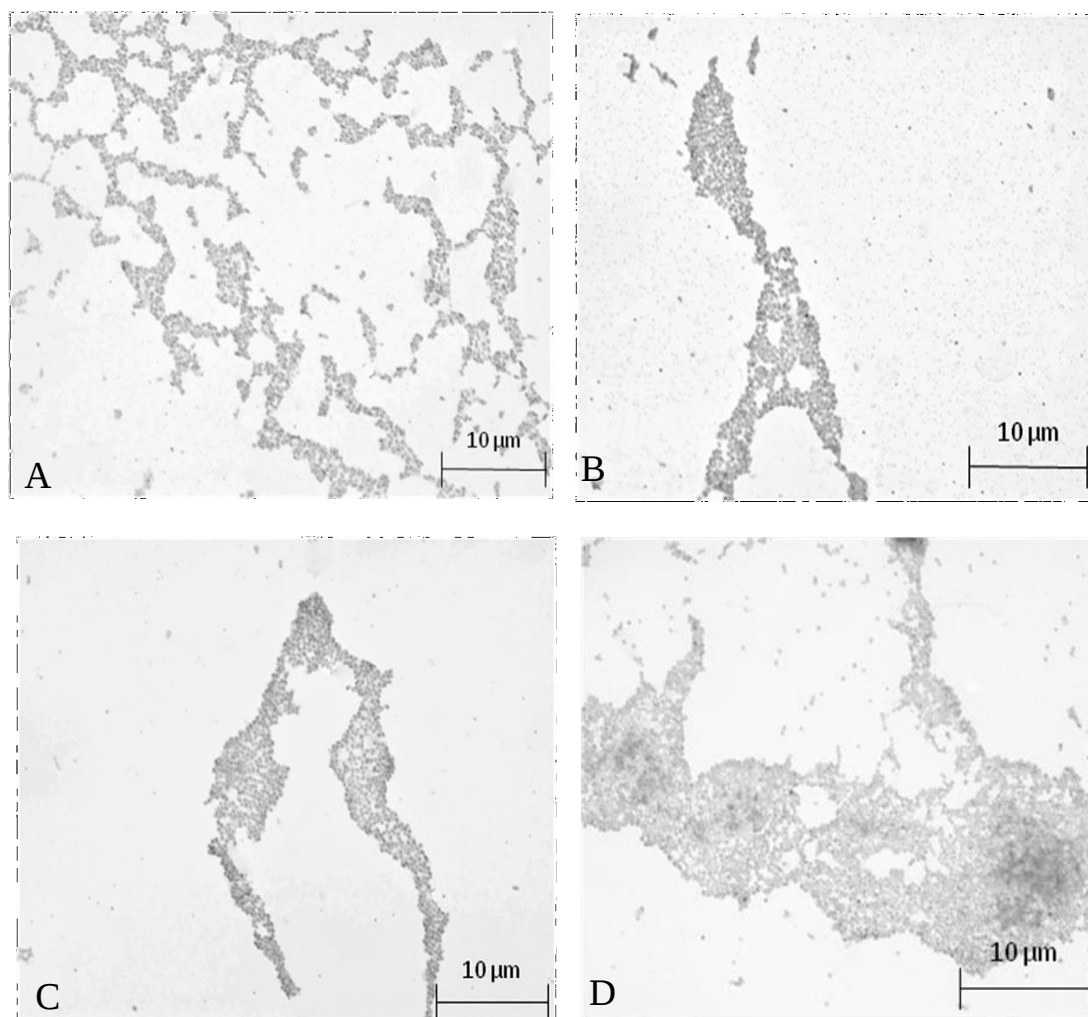
Figura 1 - Biofilme da cepa *E. coli* DO7785 associada á EI, após 18h de incubação à 37°C. A



Legenda: A cepa *E. coli* DO7785, apresentou formação de biofilme forte.

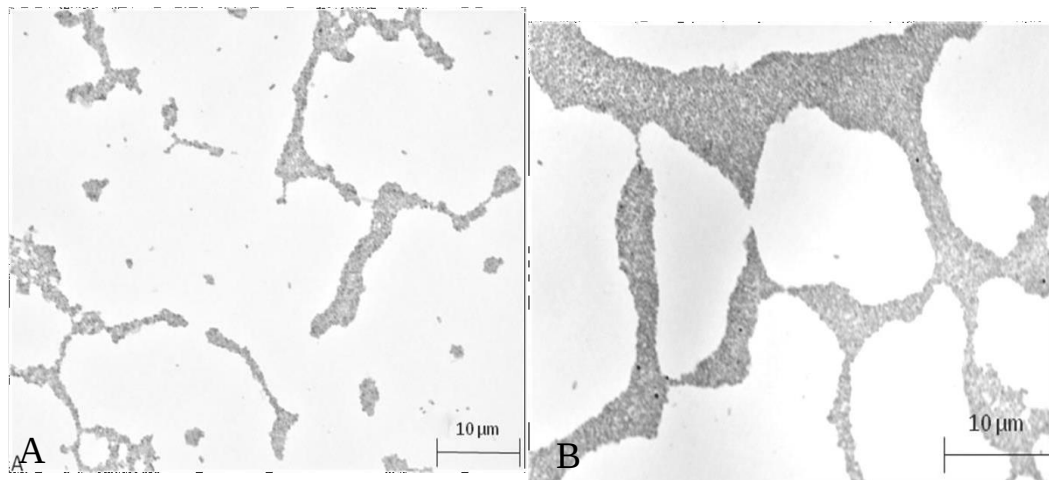
Fonte: A autora, 2019

Figura 2 - Biofilme de cepas de *K. pneumoniae* associadas á EI após 18h de incubação à 37°C



Legenda: Cepas *K. pneumoniae* exibindo biofilme. A cepa Kp1 (A) produziu biofilme moderado, onde pode ser observado o tapete bacteriano distribuído sobre a superfície. As cepas Kp2 (B) e Kp3 (C) produziram biofilme moderado, onde nota-se o tapete de bactérias concentrado de forma discreta sobre a superfície. A cepa Kp4 (D) produziu biofilme moderado com tapete intenso. Fonte: A autora, 2019.

Figura 3: Biofilme de cepas controles EAEC 042 e UPEC I64 após 18h de incubação à 37 °C.



Legenda: Cepa controle EAEC 042 (A) apresentou formação de biofilme moderadamente atípico. A cepa I64 (B) apresentou biofilme forte. Fonte: A autora, 2019.

Quadro 2. Padrão de formação de biofilme qualitativo das cepas associadas á EI após 18 hrs de incubação à 37°C.

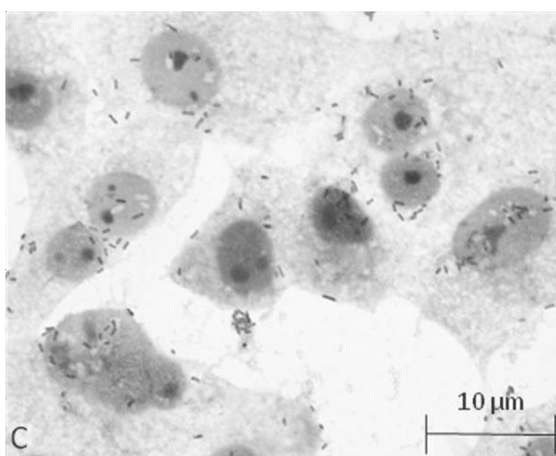
Cepas	Formação de biofilme
042a	Moderado
I64a	Forte
DO7785b	Forte
Kp1c	Moderado
Kp2c	Moderado
Kp3c	Moderado
Kp4c	Forte

Legenda: Sumarização do padrão de formação de biofilme. a: Cepas controle, b: *E.coli*, c: *K. pneumoniae*.

3.3 Aderência em linhagem celular Vero das amostras clínicas de Enterobacteriaceae

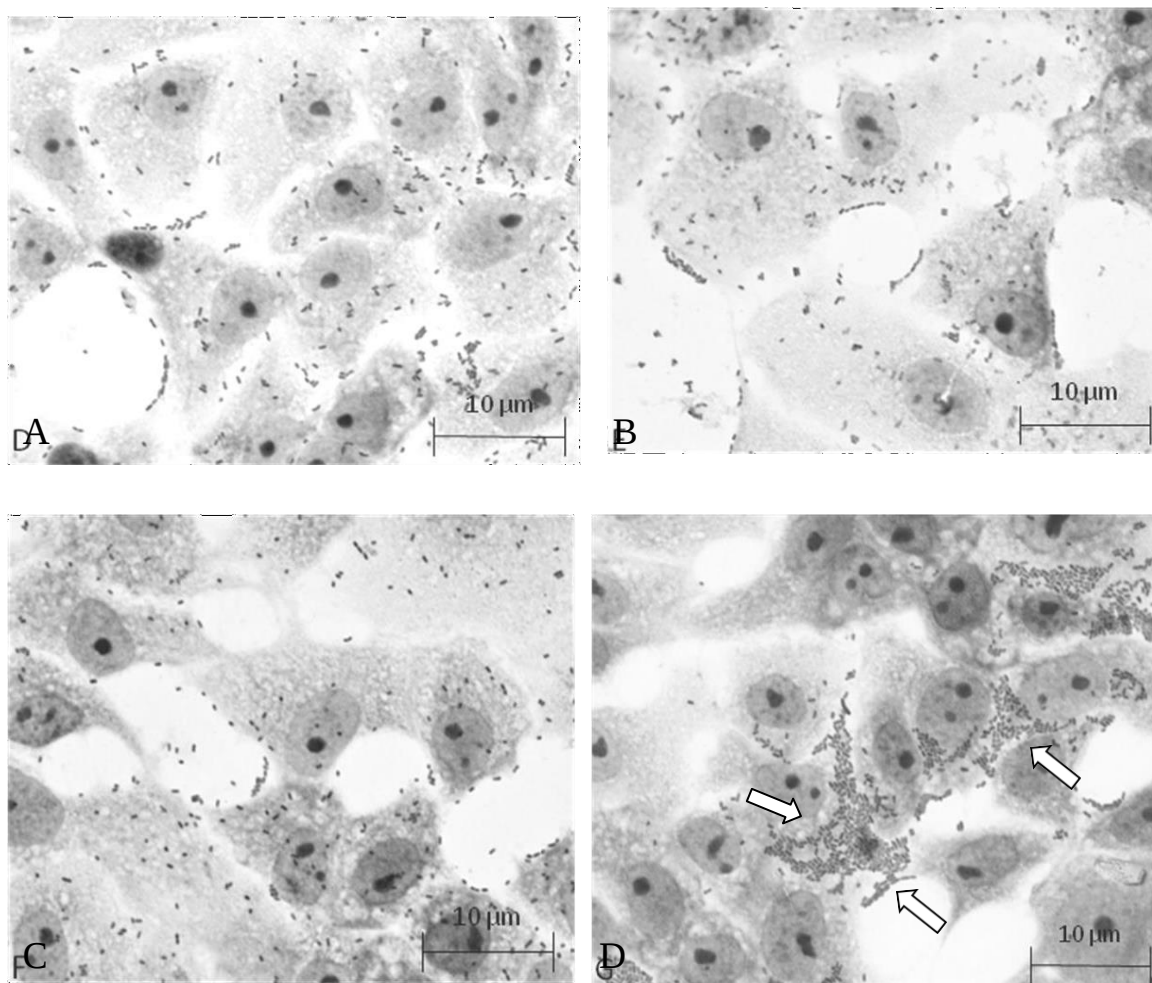
A cepa *E. coli* DO7785 mostrou fraca interação com a linhagem celular Vero após o período de incubação (figura 4). Nas cepas *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4 também foi observada aderência em células Vero (figura 5). Todas as cepas foram comparadas com as cepas controles EAEC 042 e UPEC I64 (figura 6).

Figura 4 - Aderência de *Escherichia coli* 7785 em células Vero



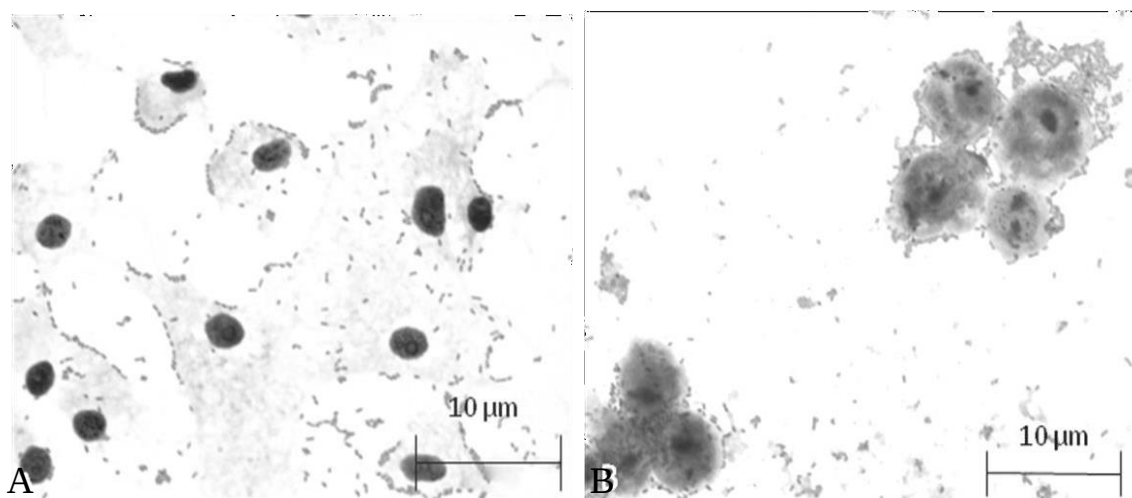
Legenda: A cepa apresentou aderência fraca onde se visualiza poucas bactérias interagindo com as células Vero. Fonte: A autora, 2019.

Figura 5 - Aderência de cepas de *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4 em células Vero



Legenda: Aderência de cepas Kp1 (A), Kp2 (B), Kp3 (C) e Kp4 (D). As cepas Kp1, Kp2 e Kp3 apresentaram aderência moderada onde se observam bactérias isoladas na superfície do tapete. A cepa Kp4 apresentou padrão agregativo caracterizado por bactérias aderidas em formato de “tijolos empilhados” (setas). Fonte: A autora, 2019.

Figura 6 - Aderência de cepas controle EAEC 042 e UPEC I64 em células Vero

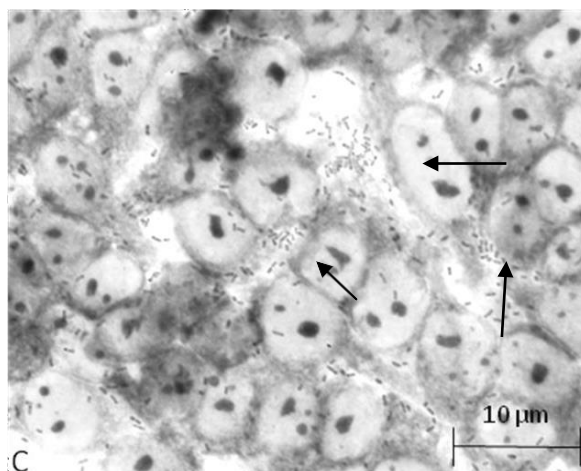


Legenda: Aderência de EAEC 042 (A) e UPEC I64 (B) apresentando padrão de aderência agregativo atípico na linhagem celular Vero. Fonte: A autora, 2019.

3.4 Aderência em linhagem celular HEp-2 das amostras clínicas de Enterobacteriaceae

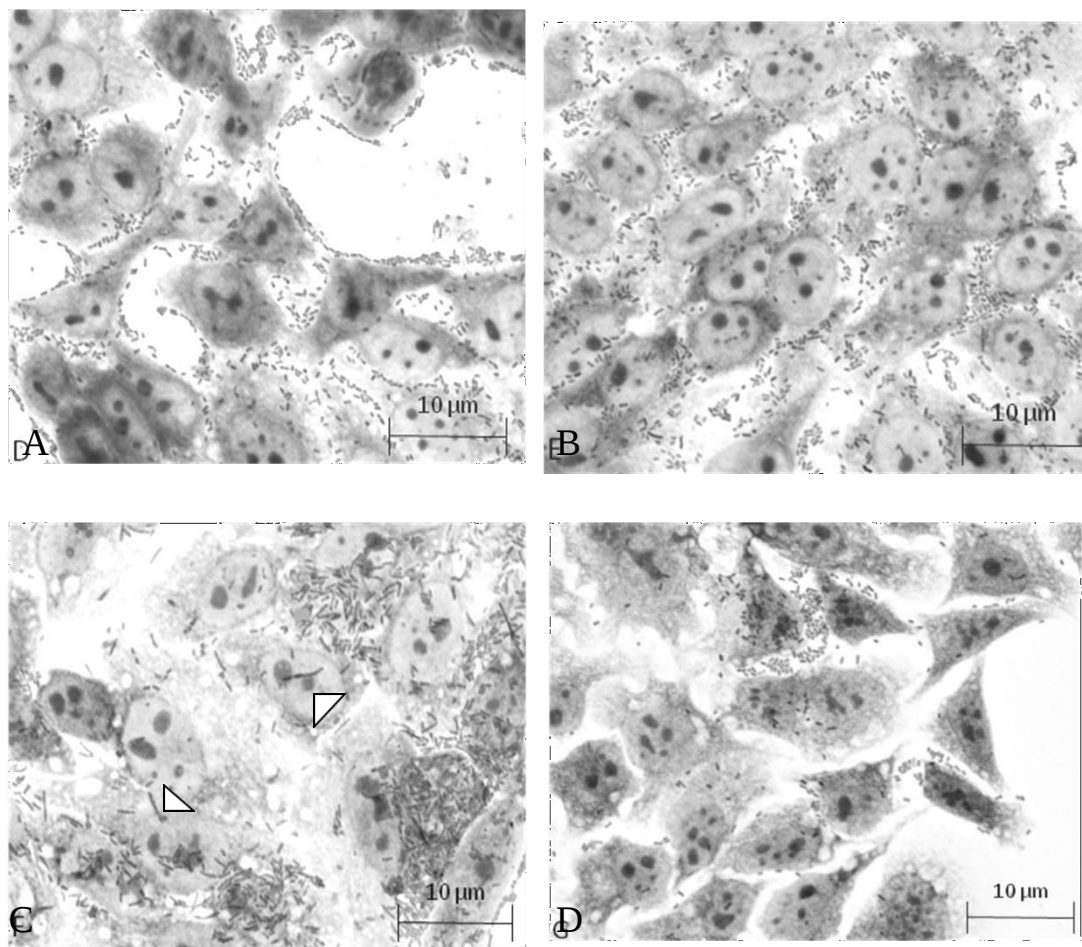
A linhagem celular HEp-2 é característica para aderência por UPECs. A cepa *E. coli* DO7785 apresentou interação significativa com padrão celular HEp-2 (figura 7). As cepas *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4 também apresentaram capacidade de interação com a HEp-2 (figura 8). A capacidade de interação das cepas com a linhagem celular foi comparada com cepas controle positivo EAEC 042 e UPEC I64 (figura 9).

Figura 7 - Aderência de *Escherichia coli* 7785 em células HEp-2



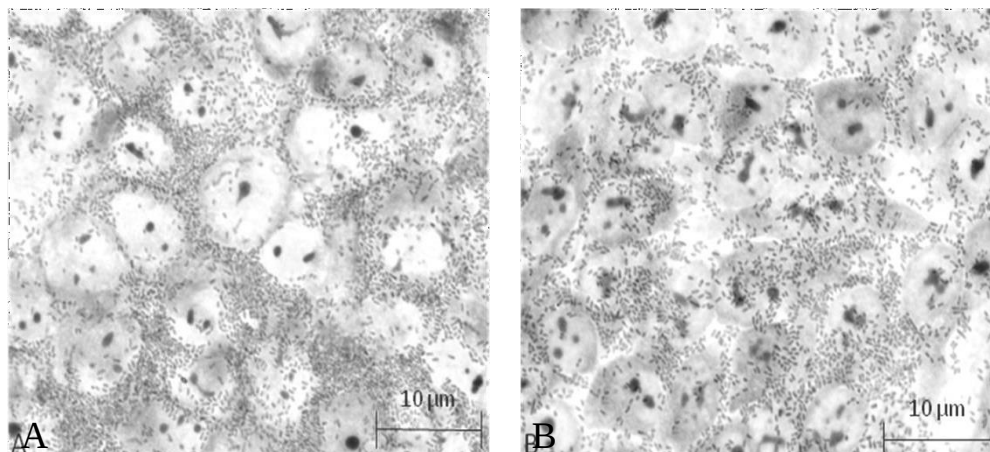
Legenda: Cepa apresentou aderência moderada. Nota-se bactérias dispersas sobre o tapete de células Hep-2 (setas). Fonte: A autora, 2019.

Figura 8 - Aderência de cepas de *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4 em células Hep-2



Legenda: Aderência de cepas *K. pneumoniae*: A cepa Kp1 (A) exibiu aderência intensa com padrão agregativo atípico onde observa-se bactérias aderidas na periferia das células; na cepa Kp2 (B) observa-se aderência moderada com padrão difuso; a cepa Kp3 (C) apresentou aderência moderada com produção de filamentos (cabeça de seta); a cepa Kp4 (D) apresentou aderência discreta com poucas bactérias dispersas sobre o tapete celular. Fonte: A autora, 2019.

Figura 9. Aderência de cepas controle EAEC 042 e UPEC I64 em células HEp-2



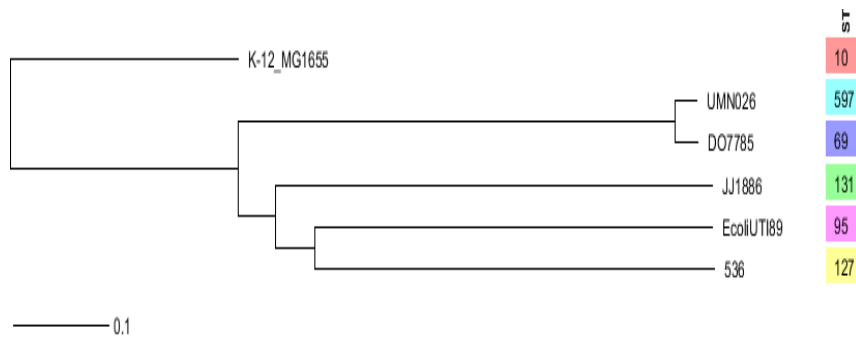
Legenda: Cepas controle: EAEC 042 (A) e UPEC I64 (B) apresentaram aderência intensa em padrão difuso atípico. Fonte: A autora, 2019.

3.5 Sequenciamento e cgMLST

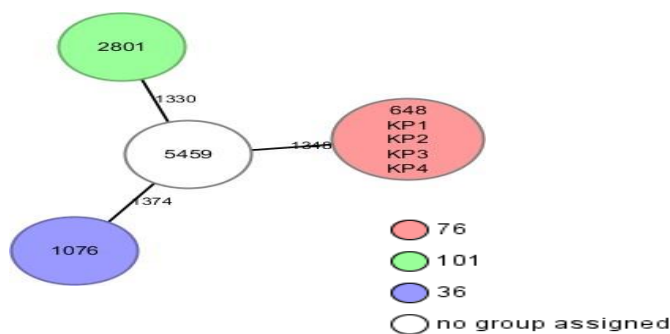
O seqüenciamento completo do genoma (WGS) das cepas associadas á endocardite infecciosa mostrou que a cepa *E. coli* DO7785 pertence ao ST69 e sorotipo O153:H2 enquanto todas as cepas *K. pneumoniae* pertencem ao ST76 e sorotipo K2. Cepas *E. coli* e *K. pneumoniae* de origem urinária foram usadas no estudo como controle (Figura 10).

Figura 10. cgMLST das cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

A



B



Legenda: Figura A mostra que a cepa *E. coli* DO7785 pertence ao ST69 e a figura B mostra que todas as cepas de *K. pneumoniae* pertencem ao ST76 assim como a cepa de origem urinária 648. Fonte: A autora, 2019.

3.6 Perfil de resistência fenotípico

O perfil de resistência mostrou que a cepa *E. coli* DO7785 foi resistente a Trimetropim, Trimetropim/Sulfametoxazol e Ampicilina, enquanto que todas as cepas Kp foram resistente para Ampicilina, Fosfomicina e Nitrofurantoina (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos das cepas estudadas.

Cepas	Espécies	Perfil fenotípico de resistência
Do7785	<i>E. coli</i>	Ampicilina, Trimetoprim, Trimetoprim+Sulfametozasol
Kp1	<i>K. pneumoniae</i>	Ampicilina, Nitrofurantoina e fosfomicina
Kp2	<i>K. pneumoniae</i>	Ampicilina, Nitrofurantoina e fosfomicina
Kp3	<i>K. pneumoniae</i>	Ampicilina, Nitrofurantoina e fosfomicina
Kp4	<i>K. pneumoniae</i>	Ampicilina, Nitrofurantoina e fosfomicina

3.7 Análise molecular dos genes de resistência

O WGS também revelou os genes de resistência presentes em cada uma das cepas. A cepa *E. coli* DO7785 apresentou os genes de resistência a aminoglicosídeos, *strA*, *aada5* e *strB*, a sulfonamida, *sul1* e *sul2*, a trimetoprim, *drfA17* e a beta- lactâmicos *blaTEM-1B*. A cepa *K. pneumoniae* mostrou apresentar os genes de resistência a fosfomicina *fosA* e a quinolona, *oqxA* e *oqxB*. Ambas as cepas apresentam genes de resistência a beta-lactâmicos, *blaSHV-1* (Tabela 2).

Tabela 2. Genes de resistência das cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Cepas	Espécies	Genes de resistência
7785	<i>E. coli</i>	<i>strA</i> , <i>aada5</i> , <i>strB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>drfA17</i> e <i>blaTEM-1B</i>
Kp1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> e <i>blaSHV-1</i>
Kp2	<i>K. pneumoniae</i>	<i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> e <i>blaSHV-1</i>
Kp3	<i>K. pneumoniae</i>	<i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> e <i>blaSHV-1</i>
Kp4	<i>K. pneumoniae</i>	<i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> e <i>blaSHV-1</i>

3.8 Análise molecular dos genes de virulência

Foram investigados 20 genes de virulência, somente 13 genes foram detectados. Foi revelado que a cepa *E. coli* DO7785 possui os genes *iutA*, *allS*, *fimH*, *OmpA* e *irp2*. Enquanto que todas as cepas Kp possuem os genes *mrkD*, *urea*, *uge*, *pgaC*, *wzi*, *fimC*, *OmpA*, *wabG* e *hgpA* (Quadro 3).

Quadro 3: Genes de virulência.

	<i>ybtS</i>	<i>mrkD</i>	<i>rmpA</i>	<i>iutA</i>	<i>allS</i>	<i>fur</i>	<i>fimH</i>	<i>ureA</i>	<i>uge</i>	<i>pgaC</i>	<i>wzi</i>	<i>fimC</i>	<i>OmpA</i>	<i>IroN</i>	<i>wabG</i>	<i>hgpA</i>	<i>irp2</i>
KP1																	
KP2																	
KP3																	
KP4																	
DO7785																	

Legenda: Os genes de virulência presentes nas amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* identificados pelo seqüenciamento estão indicados pelo quadro vermelho.

4 DISCUSSÃO

O diagnóstico de EI tem sido um desafio para a medicina desde a definição proposta por Osler em 1885. No entanto, Pelletier e Petersdorf (1977), propuseram uma nova definição dividida em três categorias: (1) definida, em caso de confirmação cirúrgica ou autópsia, (2) provável, por meio de critério clínico e (3) possível, também por meio de avaliação clínica. No entanto, EI também é definida como uma infecção cardíaca causada pela implantação de dispositivos eletrônicos intracardíacos como marcapassos e próteses, resultando em infecções relacionadas ao uso de cateteres e bacteremias (KARCHMER A. W., LONGWORTH D. L., 2002).

Entre as bactérias Gram-positivas *S. aureus* é o principal agente etiológico de EI, sendo responsável por 25% a 50% da taxa de mortalidade (CABELL C. H. et al., 2002 e HOGJEVIK H. et al., 1995), estando associado a diversas complicações como embolismo, choque séptico e HAIE (PAZDENIK M. et al., 2016). No entanto, EI também pode ser causada por bacilos Gram-negativos (BGNs) do grupo não-HACEK sendo considerada uma infecção rara, contudo, com alta taxa de mortalidade (FOWLER Jr V. G. et al., 2002). Nesse caso, aspectos epidemiológicos, diagnóstico e prognósticos de EI são poucos conhecidos devido ao escasso número de casos que incluem BGNs (NOUREDDINE M. et al., 2011). Assistência associada à saúde também contribui para o desenvolvimento da infecção como aumento do uso de cateteres endovasculares, cateteres venosos centrais, manipulação do trato gastrointestinal e sondas urinárias. Esses fatores estão relacionados à metade dos casos de EI por BGNs. Uma das principais portas de entrada para o desenvolvimento de EI causada por *E. coli* é o trato urinário (COHEN P. S. et al., 1980, MICOL R. et al., 2006 e MORPETH S. et al., 2007). Estudo realizado na França, mostrou que metade dos pacientes com EI por *E. coli* apresentaram o trato urinário como reservatório do patógeno (LOUBET P. et al., 2015). A idade também é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento da infecção (IUNG B. et al., 2003). Em estudo conduzido por Meyers et al. foi observado episódios de bacteremia entre pacientes acima de 65 anos e o trato urinário foi a principal porta de entrada, evoluindo para NVE em pacientes acima de 70 anos. Em pacientes idosos (> 70 anos) bacteremia por gram-negativos é mais comum e a taxa de mortalidade é maior do que em jovens (MCDUE J. D., 1987). Em infecções adquiridas na comunidade a predominância é de *E. coli* e *K. pneumoniae* (ISMAIL N. H., 1997).

HAIE é considerada uma categoria de EI que apresenta maior índice de mortalidade e morbidade quando comparada a CAIE (GIANNITSIOTI E. et al., 2007 e LOMAS J. M. et al., 2009) e essa característica se deve a fatores de risco que contribuem para o aumento desse tipo de infecção em hospitais. Em estudo prospectivo realizado por Lomas et al. (2009), foi observado a taxa de mortalidade por HAIE de 44,9%, valor similar a outros estudos já realizados. Nosso estudo mostrou que as cepas HAIE e CAIE, são multiresistentes (multidrug-resistant – MDR). Falcone et. al. (2018) demonstraram que microrganismos BGNs com etiologia MDR foram determinantes para o aumento da mortalidade de pacientes com EI por BGNs não-HACEK. O aumento de cepas EI MDR é uma preocupação crescente entre os clínicos (CECCARELLI G. et al., 2013, GUTIÉRREZ- GUTIÉRREZ B. et al., 2017, ORSI G. B. et al., 2011 e TACCONELLI E. et al., 2014).

A cepa *E. coli* DO7785 isolada de amostra de bacteremia associada a CAIE apresentou resistência a agentes da família dos beta-lactâmicos como ampicilina e a agentes da família das sulfonamidas como trimetopim e a trimetopim e sulfametoazol. A susceptibilidade a fosfomicina também foi testada, onde a *E. coli* não apresentou resistência para a mesma. Curiosamente, mesmo apresentando resistência aos beta-lactâmicos, a cepa *E. coli* DO7785 não é produtora de ESBL. As quatro cepas de *K. pneumoniae* apresentaram resistência á ampicilina, ao aminoglicosídeo, nitrofurantoína e fosfomicina. As cepas também não são produtoras de ESBL. Estudos já realizados mostraram haver alta prevalência de resistência a ampicilina em amostras de *E. coli* (ESTEVE-PALAU E. et al., 2015). Além disso, infecções causadas por BGNs resistentes a fosfomicina, inclusive endocardites, tem apresentado remissão quando tratada com fosfomicina intravenosa. Essa é uma importante opção quando essas infecções estão associadas a pacientes com fatores de risco e falhas a outras classes de antibióticos (ZHANEL G. G. et al., 2016).

Mutações nos genes cromossomais ou plasmídiais podem ser responsáveis pela aquisição de resistência á algumas classes de antibióticos pelos microrganismos (BENNETT P. M. 2008). Os testes moleculares mostraram que a cepa *E. coli* DO7785 apresentou gene de resistência a aminoglicosídeos (*strA*, *strB* e *aadA5*), a beta- lactamases (*blaTEM-1B*), a sulfonamidas (*sul1* e *sul2*) e a trimetopim (*dfrA17*). Todas as cepas *K. pneumoniae* apresentam resistencia a beta-lactamases *blaSHV-1* e a fosfomicina *fosA*. Particularmente as cepas Kp1 e Kp3 apresentam resistência as quinolonas *oqxA* e *oqxB*. Todos genes de resistência encontrados nas cepas *K. pneumoniae* são os genes cromossomais e condizem com o fenótipo de resistência apresentado pelas cepas.

Também analisamos o perfil genético de virulência nas cepas em estudo. Um dos genes identificados foi o gene *ureA* que, quando expresso, tem sido relacionado a ligação da *K. pneumoniae* ao cateter em pacientes com endocardite e também com infecção no trato urinário (ITU). Outros genes de virulência identificados nas quatro amostras de *K. pneumoniae*, como *uge*, *fimC* e *hgpA* já foram descritos por exercer importante papel na patogênese de dessa espécie em ITU (DI MARTINO P. et al., 1993, JONES C. H. et al., 1995 e LIN W. H. et al., 2015).

O gene *uge* (uridina difosfato galacturonato 4-epimerase) foi localizado no antígeno O1 do LPS da membrana externa e no polissacarídeo capsular K2 das cepas de *K. pneumoniae* indicando uma possível participação na indução de ITU por essas cepas (ARAKAWA A. et al., 1995; KELLY R. F. et al., 1993; REGUE M. et al., 2001 e REGUE M. et al., 2004). Alguns estudos revelaram que cepas mutantes que não expressavam o gene *uge*, apresentavam um fenótipo caracterizado pela ausência completa da cápsula K e antígeno O no LPS, levando a perda da virulência e com isso à incapacidade de promover infecção urinária (REGUE M. et al., 2004). A proteína Uge apresentou 35% de similaridade com a proteína Cap1J responsável por sintetizar acapsula tipo 1 presente em cepas de *Streptococcus pneumoniae* (MUNOZ R. et al., 1999). *hgpA* é um gene expresso pela cepa HI689 da espécie *Haemophilus influenzae*, responsável por codificar proteína HgpA que liga unidades de hemoglobinas ao complexo hemoglobina-haptoglobina presentes na superfície celular (JIN H. et al., 1999). Mutações no gene *hgpA* podem reduzir a habilidade da cepa em utilizar o complexo hemoglobina-haptoglobina do hospedeiro (REN Z et al., 1998).

O sequenciamento mostrou que a cepa *E. coli* DO7785 expressou o gene *iutA*, normalmente presente em cepas uropatogênicas, sendo um gene importante de virulência associado a captação de ferro através da codificação da proteína aerobactina. O gene *iutA* também está envolvido na resistência a antibióticos (KARAMI N., WOLD A. E., ADLEBERTH I. 2017). Cepas com ST69 que carregam o gene *iutA* tendem a apresentar perfil de resistência a algumas classes de antibióticos como beta-lactâmicos, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglicosídeos e trimetoprim. (MANGES A. R et al., 2001 e TARTOF S. Y. et al. 2005). A cepa *E. coli* DO7785 apresentou um perfil de resistência a ampicilina, trimetoprim e trimetoprim e sulfametoxazol. Karami et al, (2017) observaram que 25% de cepas *E. coli* ST 69 urinárias eram resistentes a pelo menos três tipos de antibióticos, ampicilina, tetraciclina e trimetoprim. Cepas ST69 frequentemente exibe multiresistência devido a uma variedade de genes de resistência contidos em plasmídeos (MANGES A. R et al., 2001).

Além dos fatores de virulência, *K. pneumoniae* possui uma estrutura capsular que lhes permitem ser cepas hipervirulentas. Pelo menos, 78 sorotipos capsulares foram identificados e classificados em sorotipos K1 e K2 (KU Y. H., CHUANG Y. C., YU W. L. 2008). As capsulas dos sorotipos K1 e K2 protegem as cepas do sistema immune como das células fagocitárias e estão associadas à cepas invasivas (LIN J. C. et al., 2006 e SHON A. S., BAJWA R. P., RUSSO T. A. 2013). No nosso estudo, todas as cepas Kps foram classificadas como pertencentes ao sorotipo K2. Em estudo conduzido por Remya et al. (2018) o sorotipo predominante foi o K2. No entanto, outros grupos revelaram a prevalência do sorotipo K1 em *K. pneumoniae* isoladas de pacientes com abscesso hepático no oeste da China, onde a incidência de K1 foi de (68,9%) seguido pelo sorotipo K2 (20%) (QUT. T. et al., 2015). Em estudo realizado em Taiwan, o sorotipo K1 foi identificado em 63,4% dos abscessos hepáticos e K2 somente 14,2 % (FUNG C. P. et al., 2002).

Algumas cepas são capazes de se ligar ao epitélio do hospedeiro e formar biofilme permitindo o aumento da resistência aos antimicrobianos. Esse mecanismo de virulência está associado a infecções como endocardite e ITU, sendo particularmente relevantes em infecções associadas a cateteres, próteses e dispositivos cardíacos eletrônicos (DE LA FUENTE NUNES C. et al., 2013). Investigamos a habilidade das amostras associadas a EI em formar biofilme, onde foi observado que todas elas foram capazes de formar biofilme. Todas as cepas de *K. pneumoniae* apresentaram biofilme moderado enquanto a cepa de *E. coli* foi capaz de formar biofilme forte. O teste molecular mostrou que todas as cepas possuíam um importante gene de virulência associado com a formação de biofilme. O gene *mrkD* é um operon que codifica a fimbria tipo 3 que exerce um papel importante na formação de biofilme (CLEGG S., MURPHY C. N. 2016 e DI MARTINO P. et al., 2003; JAGNOW J., GLEGG S. et al. 2003; e MAO B. H. et al., 2012). Também foi revelada a presença de *fimC*, gene de virulência que codifica a chaperona FimC. A proteína FimC é parte de um complexo de adesinas do tipo 1 que tem um papel fundamental na adesão do patógeno à célula do hospedeiro e também na formação de biofilme (JONES C. H. et al., 1995). Curiosamente, a cepa de *E. coli* 7785 expressou gene de virulência normalmente expresso por UPEC. O gene *fimH* codifica uma proteína FimH presente na chaperona fimbria tipo 1, permitindo que o microrganismo se ligue e invada a bexiga do hospedeiro, exercendo um importante papel na formação de biofilme e aderência ao tecido urinário (NORINDER B. S. et al., 2012; WU X. R., SUN T. T., MEDINA J. J. 1996).

Estudos epidemiológicos observaram que a baixa frequência de EI por Enterobacteriaceae é atribuída à pouca habilidade de BGNs aderir a valvas cardíacas

(FALCONE M. et al., 2018). Foi avaliado nesse estudo a capacidade das amostras de em aderir em duas linhagens celulares, HEp-2 e Vero. Todas as amostras associadas com EI foram capazes de aderir nas duas linhagens testadas, mas com intensidades e padrões diferenciados. Esses resultados mostraram que os isolados EI apresentam habilidade em aderir a células do hospedeiro. Tanto a cepa *E. coli* DO 7785 como todas as cepas *K. pneumoniae* apresentaram o mesmo gene que sintetiza a proteína de membrana externa *OmpA* e apresentaram habilidade de interação com as linhagens celulares Vero e HEp-2. Além de expressar a maior porina na membrana externapresentes entre os BGNS, o gene também atua conferindo importantes funções para a patogênese bacteriana, como resistência contra antibióticos, indução da morte celular e principalmente aderência, invasão e persistência á células hospedeiras (ANTHONY W., SAHLU A. 2013 e SATO Y. et al., 2017). A aderência se dá pela ligação não covalente do domínio C-terminal da porina presente na membrana externa com o peptidoglicano da matriz extracelular da célula hospedeira (HANCOK R. E. W., KARUNARATNE D.,BERNEGGER-EGLI C., 1994).

CONCLUSÃO

Em cepas isoladas de endocardite infecciosa, a análise molecular das cepas *E. coli* identificou genes relacionados á resistência a aminoglicosídeos, *strA*, *aada5* e *strB*, a sulfonamida, *sul1* e *sul2*, a trimetropim, *drfA17* e a beta-lactâmicos *blaTEM-1B*. Genes de resistência para fosfomicina *fosA*, a beta-lactâmicos, *blaSHV-1* e a quinolona, *oqxA* e *oqxB* foram identificados em *K. Pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4.

A análise molecular revelou que a cepa *E. coli* 7785 possui os genes de virulência *iutA*, *allS*, *fimH*, *ompA* e *irp2*. As cepas *K. pneumoniae* possuiu os genes *mrkD*, *urea*, *uge*, *pgaC*, *wzi* *fimC*, *OmpA*, *wabG* e *hgpA*.

As cepas do estudo *E. coli* e *K. pneumoniae* pertencem a ST 69 e 76, respectivamente que são considerados cepas capazes de causar sérias infecções, apresentando grande risco a saúde. No entanto, eles contêm o mesmo fenótipo de resistência e de virulência, normalmente presentes em clones hipervirulentos.

As análises fenotípicas mostraram que as cepas apresentaram habilidade em formar biofilme em superfície abiótica e de aderir em células epiteliais renais e de carcinoma de laringe. Mesmo não apresentando perfil molecular de hipervirulência, *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de EI possuem atributos importantes relacionados à virulência bacteriana.

REFERÊNCIAS

- AKOVA, M.; DAIKOS, G. L.; TZOUVELEKIS, L. et al. **Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria.** [S.l.; s.n.] Clin Microbiol Infect. 2012.
- ANDERSON, M. J.; JANOFF, E. N. ***Klebsiella* endocarditis:** Report of two cases and review. 2. ed. [S.l.; s.n.] Clin Infect Dis. Feb. 1998.
- ANTÃO, E. M.; WIELER, L. H.; EWERS, C. **Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.** Gut Pathog. [S.l.; s.n.]. 2009.
- ARAKAWA, A.; WACHAROTAYANKUN, R.; NAGATSUKA, T. et al. **Genomic organization of the *Klebsiella pneumoniae* cps region responsible for serotype K2 capsular polysaccharide synthesis in virulent strain.** [S.l.; s.n.] Chedid. J. Bacteriol. 1995.
- AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A. et al. **The RAST server:** rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. [S.l., s.n.]. 2008
- BADDOUR, L. M.; WILSON, W. R.; BAYER, A. S. et al. **Infective endocarditis:** diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. 23. ed. [S.l.; s.n.] Circulation. 2005.
- BENNETT, P. M. **Plasmid encoded antibiotic resistance:** Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. [S.l.; s.n.] British Journal of Pharmacology. 2008.
- BIEDENBACH, D. J.; MOET, G. J.; JONES, R. N. **Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002).** 1. ed. Diagn Microbiol Infect Dis. [S.l.; s.n.] Set 2004.
- BINGEN-BIDOIS, M.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S. et al. **Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains.** [S.l.; s.n.] Infect Immun. 2002.
- BIRLUTIU, V.; BIRLUTIU, R. M.; COSTACHE, V. S. **Viridans: A case report streptococcal infective:** A case report *endocarditis:* A case report associated with fixed orthodontic appliance managed surgically by mitral valve plasty: A case report. 27. ed. [S.l.; s.n.] Medicine. 2018.
- BLUMENTAL, S.; REYNDERS, M.; WILLEMS, A. et al. **Enteroviral infection of a cardiac prosthetic device.** 6. ed. [S.l.; s.n.] Clin Infect Dis. 2011.

BRADFORD, P. A. **Extended-spectrum-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat.** 14. ed. rev. Clin. Microbiol. [S.I.]. 2001.

BRANGER, S.; CASALTA, J. P.; HABIB, G. et al. ***Escherichia coli* endocarditis: seven new cases in adults and review of the literature.** 8. ed. [S.I.; s.n.] Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Aug 2005.

BOR, D. H.; WOOLHANDLER, S.; NARDIN, R. et al. **Infective endocarditis in the U.S., 1998–2009: a nationwide study.** 8. ed. [S.I.; s.n.] PLoS One. 2013.

BOSSHARD, P. P.; KRONENBERG, A.; ZBINDEN, R. et al. **Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience.** 2. ed. [S.I.; s.n.] Clin Infect Dis. 2003.

BOTELHO-NEVERS, E.; THUNY, F.; CASALTA, J. P. et al. **Dramatic Reduction in Infective Endocarditis–Related Mortality With a Management-Based Approach.** 14. ed. [S.I.; s.n.] Arch Intern Med. 2009.

BOUZA, E.; MENASLVAS, A.; MUNOZ, P. et al. **Infective endocarditis—a prospective study at the end of the twentieth century: new predisposing conditions, new etiologic agents, and still a high mortality.** Baltimore. [s.n.] Medicine. 2001.

CABELL, C. H.; JOLLIS, J. G.; PETERSON, G. E. et al. **Changing patient characteristics and the effect on mortality in endocarditis.** 1. ed. Arch Intern Med. 2002.

CARMELI, Y.; AKOVA, M.; CORNAGLIA, G. et al. **Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control.** [S.I.; s.n.] Clin Microbiol Infect. 2010.

CECCARELLI, G.; FALCONE, M.; GIORDANO, A. et al. **Successful ertapenem-doripenem combination treatment of bacteremic ventilator-associated pneumonia due to colistin-resistant KPC- producing *Klebsiella pneumoniae*.** [S.I.; s.n.] Antimicrob Agents Chemother. 2013.

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. **Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*.** 1. ed. [S.I.; s.n.] Microbiology Spectrum. 2016.

CLEGG, S.; OLD, D. C.: **Fimbriae of *Escherichia coli* K-12 strain AW405 and related bacteria.** 2. ed. [S.I.; s.n.] J Bacteriol. 1979.

COHEN, P. S.; MAGUIRE, J. H.; WEINSTEIN, L. **Infective endocarditis caused by Gram negative bacteria: a review of the literature, 1945–1977.** 4. ed. [S.I.; s.n.] Prog. Cardiovasc. Dis. 1980.

CONFER, A. W.; AYALEW, S. **The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity.** Elsevier. [s.n.] Veterinary Microbiology. May 2013.

COSGROVE, S. E.; KAYE, K. S.; ELIOPOULOS G. M. et al. **Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species.** [s.n.] Arch. Intern. Med. 2002.

CRUM, N. F.; LEE, R. U.; THORNTON, S. A., et al. **Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** [S.l.; s.n.] Am J Med. 2006.

DALL, L.; BARNES, W. G.; GIBBS, H. R. et al. **Endocarditis caused by b-lactamase-producing *Haemophilus influenzae*.** 3. ed. [S.l.; s.n.] South. Med. J. 1987.

DAS, M.; BADLEY, A. D.; COCKREILL, F. R. et al. **Infective endocarditis caused by HACEK microorganisms.** [S.l.; s.n.] Ann.Rev. Med. 1997.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L. et al. **Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies.** 5. ed. [S.l.; s.n.] Current Opinion in Microbiology. 2013.

DHAWAN, V. K. **Infective endocarditis in elderly patients.** [S.l.; s.n.] Clin Infect Dis. 2002.

DAYER, M. J.; JONES, S.; PRENDERGAST, B. et al. **Incidence of infective endocarditis in England, 2000-13: a secular trend, interrupted time-series analysis.** [S.l.; s.n.] Lancet. 2015.

DIAGO- NAVARRO, E.; CHEN, L. PASSET, V. et al. **Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits.** [S.l.; s.n.] J. Infect. Dis. 2014.

DI MARTINO, P.; CAFFERINI, N.; JOLY, B. et al. ***Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces.** [S.l.; s.n.] Research in Microbiology. 2003.

DOI, Y.; PATERSON, D. L. **Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.** [S.l.; s.n.] Semin Respir Crit Care Med. 2015.

EDEN, C. S.; HANSSON, H. A.: ***Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells.** 1. ed. [S.l.; s.n.] Infect Immun. 1978.

EISENSTEIN, B. I.; ZALEZNIK, D. F. **Enterobacteriaceae.** Principles and practice of infectious diseases. 5. ed. G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin. Philadelphia, Pa. 2000.

EL-KHOLY, A. A.; EL-RACHIDI, N. G.; EL-ENANY, M. G. et al. **Impact of serology and molecular methods on improving the microbiologic diagnosis of infective endocarditis in Egypt.** [S.l.; s.n.] Infection. 5. ed. 2015.

ESTEVE-PALAU, E.; SOLANDE, G.; SANCHEZ, F. et al. **Clinical and economic impact of urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* requiring hospitalization**: A matched cohort study. *Journal of Infection*. 6. ed. [S.l.; s.n.] 2015.

FALCONE, M.; TISEO, G.; DURANTE-MANGONI, E. et al **Risk Factors and Outcomes of Endocarditis Due to Non-HACEK Gram-Negative Bacilli**: Data from the Prospective Multicenter Italian Endocarditis Study Cohort. [S.l.; s.n.] *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018.

FEDERSPIEL, J. J.; STEARNS, S. C.; PEPPERCORN, A. F. et al. **Increasing US rates of endocarditis with *Staphylococcus aureus***: 1999-2008. [S.l.; s.n.] *Arch Intern Med*. 2012.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. **The biofilm matrix**. 8. ed. [S.l.; s.n.] *Nat. Rev. Microbiol*. 2010.

FLORES-MIRELES, A.L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M. et al. **Urinary tract infections**: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. 13. ed. [S.I.; s.n.]. *Nat. Rev. Microbiol*. 2015.

FOWLER Jr, V. G.; SCHELD, W. M.; BAYER, A. S. **Endocarditis and intravascular infections**. 6th ed. New York Mandell G. L. Elsevier Churchill Livingstone. Principles and practice of infectious disease. 2005.

FUNG C. P.; CHANG F. Y.; LEE S. C. et al. **A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess**: Is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? [S.l.; s.n.] *Gut*. 2002.

GEBRE-SEALSSIE, S. **Antimicrobial resistance patterns of clinical bacterial isolates in south western Ethiopia**. 4. ed. Ethiopia. *Ethiop Med J*. [s.n.] 2007 Oct.

GERVEN, N. V.; SANDER, E.; VERREN, V. D. et al. **The role of functional amyloids in bacterial virulence**. [S.l.; s.n.] *Yjmbi* 2018.

GIANNITSIOTI, E.; SKIADAS, I.; ANTONIADOU, A. et al. **Nosocomial vs. community-acquired infective endocarditis in Greece**: changing epidemiological profile and mortality risk. [S.l.; s.n.] *Clin Microbiol Infect*. 2007.

GIROMETTI, N.; LEWIS, R. E.; GIANNELLA, M. et al. ***Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection**: Epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. [s.n.] [Baltimore] *Medicine*. 2014.

GOULD, K.; RAMIREZ-RONDA, C. H.; HOLMES, R. K. et al. **Adherence of bacteria to heart valves in vitro**. [S.l.; s.n.] *J Clin Invest*. 1975.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, B. et al. **Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (INCREMENT)**: a retrospective cohort study. [S.l.; s.n.] *Lancet Infect Dis*. 2017.

HANCOCK, R. E. W.; KARUNARATNE, D.; BERNEGGER-EGLI, C. **Molecular organization and structural role of outer membrane macromolecules.** [S.l.; s.n.] New Comp Biochem. 1994.

HARRIS, S. R.; CARTWRIGHT, E. J.; TOROK, M. E et al. **Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study.** 13. ed. [S.I.: s.n.] Lancet Infect Dis. 2013.

HOBOT, J. A.: **Bacterial Ultrastructure.** In **Molecular Medical Microbiology.** [S.l.] Sussman M. Academic Press. 2001.

HOEN, B.; ALLA, F.; SELTO-SUTY, C. et al. **Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France.** [S.l.; s.n.] JAMA. 2002.

HOGSEVIK, H.; OLAISSON, L.; ANDERSSON, R. et al. **Epidemiologic aspects of infective endocarditis in an urban population: A 5-year prospective study.** 6. ed. Baltimore. Medicine. 1995.

HUFNAGEL, D. A.; DEPAS, W. H.; CHAPMAN, M. R. **The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix.** [Washington DC]. [S.l.]. Microbiology Spectrum. 2015.

ISMAIL, N. H.; LIEU, P. K.; LIEN, C. T. et al. **Bacteraemia in the elderly.** Singapore. [s.n.] Ann Acad Med Singapore. 1997.

IUNG, B.; BARON, G.; BUTCHART, E. G. et al. **A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease.** [S.l.; s.n.] Eur Heart J. 2003.

JAGNOW, J.; CLEGG, S. ***Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces.** [S.l.; s.n.] Microbiology. 2003.

JIN, H.; REN, Z.; WHITBY, P. W.; et al. **Characterization of *hgpA*, a gene encoding a haemoglobin/haemoglobin-haptoglobin-binding protein of *Haemophilus influenzae*.** [S.l.; s.n.] Microbiology. Apr 1999.

JONES, C. H.; PINKNER, J. S.; ROTH, R.; et al. **FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae.** 6. ed. [S.l.; s.n.] Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; O'BRYAN, T. T. et al. **Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia.** [S.l.; s.n.] J Infect Dis. 2002.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: 'the other bad *E. coli*'.** [S.l.; s.n.] J Lab Clin Med. 2002.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. **Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.** [S.l.; s.n.]. J. Infect. Dis. 2000.

KARAMI N.; WOLD A. E.; ADLEBERTH I. **Antibiotic resistance is linked to carriage of *papC* and *iutA* virulence genes and phylogenetic group D background in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* from infants and young children.** 4. ed. [S.l.; s.n.] Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017.

KARCHEMER, A. W.; ARCHER, G. L.; DISMUKES, W. E. ***Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy.** [S.l.; s.n.] Ann Intern Med. 1983.

KARCHEMER, A. W.; LONGWORTH, D. L. **Infections of intracardiac devices.** 2 ed. Infect Dis Clin North Am. 2002.

KELLY, R. F.; SEVERN, W. B.; RICHARDS, J. C. et al. **Structural variation in the O specific polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 and O8 lipopolysaccharide: evidence for clonal diversity in *rfb* genes.** [S.l.; s.n.] Mol. Microbiol. 1993.

KHAN, Z.; SIDDIQUI, N.; SAIF, M. W. ***Enterococcus Faecalis* Infective Endocarditis and Colorectal Carcinoma: Case of New Association Gaining Ground.** 3 ed. [S.l.; s.n.] Gastroenterology Res. Jun 2018.

KIM, C. J.; YI, J. E.; KIM, Y.; CHOI, H. J. **Emphysematous endocarditis caused by AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: A case report.** [S.l.; s.n.] Medicine. 2018.

KIM M. S.; CHANG J.; CHOI S. H. et al. **Utility of a direct 16s rDNA PCR and sequencing of a etiological diagnosis of infective endocarditis.** 6. ed. [S.l.; s.n.] Anna Lab Med. 2017.

KLEIN, M.; WANG, A. **Infective Endocarditis.** [S.l.; s.n.] Journal of Intensive Care Medicine. Mar 2016.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, P. **Bacterial adhesins: function and structure.** [S.l.; s.n.] Int J Med Microbiol. 2000.

KLEVENS, R. M.; MORRISON, M. A.; NADLE, J. et al. **Invasive methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States.** [S.l.; s.n.] JAMA. 2007.

KOREA, C. G.; BADOURALY, R.; PREVOST, M. C. et al. ***Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities.** 7. ed. [S.l.; s.n.] Environ Microbiol. Jul 2010.

KORHONEN, T. K.; NURMIAHO, E. L.; RANTA, H. et al. **New Method for isolation of immunologically pure pili from *Escherichia coli*.** 2. ed. [S.l.; s.n.] Infect Immun. 1980.

KU, Y. H.; CHUANG, Y. C.; YU, W. L. **Clinical spectrum and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* causing community-acquired extrahepatic abscess.** 4. ed. [S.l.; s.n.] J Microbiol Immunol Infect. 2008.

KURIMURA, Y.; NISHITANI, C.; ARIKI, S. et al. **Surfactant protein D inhibits adherence of Uropathogenic *Escherichia coli* to the bladder epithelial cells and the bacterium-induced cytotoxicity: A possible function in urinary tract.**[Maryland] [S.n.]. The journal of biological chemistry. 2012.

LALANI, T.; KANAFANI, Z. A.; CHU, V. H. et al. **Prosthetic valve endocarditis due to coagulase negative staphylococci: findings from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database.** [S.l.; s.n.] Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006.

LAMPE, A. S.; SCHROIJEN, M. A.; SMITH, S. J. **Endocarditis due to *Aggregatibacter* (formerly: *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, a bacterium that grows in characteristic star-shaped colonies.** 14. ed. [S.l.; s.n.] Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde. 2008.

LANG, S.; WATKIN, R. W.; LAMBERT, P. A. et al. **Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis.** 3. ed. [S.l.; s.n.] J Infect. 2004.

LARSEN, M. V., CONSENTINO, S., RASMUSSEN, S. et al. **Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria.** J Clin Microbiol. [S.l., s.n.]. 2012.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J. M.; BELOIN, C. **Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics.** [S.l.; s.n.] Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2014.

LE GUERN, R.; LOIEZ, C.; ARMAND, S. et al. **Infective endocarditis: does a new 16S rDNA set of primers improve the microbiological diagnosis?** 12. ed. Taylor e Francis group. [s.n.] Infect Dis. 2015.

LEVINE, M. M. ***Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent.** 3. ed. J Infect Dis. [S.l.; s.n.] Mar 1987.

LIMAS, J. M.; F. J. MARTI'NEZ-MARCOS, A.; PLATA, R. et al. **Healthcare-associated infective endocarditis: an undesirable effect of healthcare universalization.** [S.l.; s.n.] Clin Microbiol Infect. 2010.

LIN J. C.; SIU L. K.; FUNG C. P. et al. **Impaired phagocytosis of capsular serotypes K1 or K2 *Klebsiella pneumoniae* in type 2 diabetes mellitus patients with poor glycemic control.** [S.l.; s.n.] J Clin Endocrinol Metab. 2006.

LIN, W. H.; TSENG, C. C.; WU, A. B. et al. **Clinical and microbiological characteristics of peritoneal dialysis- related peritonitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in southern Taiwan.** 3. ed. [S.l.; s.n.] Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2015.

LIVERMORE, D. M; WOODFORD, N. **The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*.** 9. ed. [S.l.; s.n.] Trends Microbiol. 2006.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R.; FOXMAN, B. et al. **Wide spread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group.** 14. ed. [S.l.; s.n.] N Engl J Med. 2001.

MAO, B. H.; CHANG, Y. F.; SCARIA, J. et al. **Identification of *Escherichia coli* Genes Associated with Urinary Tract Infections.** 2. ed. [S.l.; s.n.] Journal of Clinical Microbiology. 2012.

MCCRATE, O.A.; ZHOU, X.; REICHHARDT, C. et al. **Sum of the parts: composition and architecture of the bacterial extracellular matrix.** [S.l.; s.n.] J. Mol. Biol. 2013.

MCCUE, J. D. **Gram-negative bacillary bacteremia in the elderly: incidence, ecology, etiology, and mortality.** [S.l.; s.n.] J Am Geriatr Soc. 1987.

MICOL, R.; LORTHOLARY, O.; JAUREGUY, F. et al. ***Escherichia coli* native valve endocarditis.** 12. ed. [S.l.; s.n.] Clin Microbiol Infect. 2006.

MORPETH, S.; MURDOCH, D.; CABELL, C. H. et al. **Non-HACEK Gram-negative bacillus endocarditis.** 12. ed. [S.l.; s.n.] Ann. Int. Med. 2007.

MUNˆOZ, R.; LOPEZ, R.; DE FRUTOS, M. et al. **First molecular characterization of a uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase: an enzyme required for capsular biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 1.** [S.l.; s.n.] Mol. Microbiol. 1999.

MYLONAKIS, E.; CALDERWOOD, S. B. **Infective endocarditis in adults.** 18. ed. [S.l.; s.n.] N. Engl. J. Med. 2001.

NORINDER, B. S.; KOVES, B.; YADAV, M. et al. **Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire?** 1. ed. [S.l.; s.n.] Microb Pathog. 2012.

NOUREDDINE, M.; DE LA TORREA, J.; IVANOVA, R. et al. **Endocarditis sobre válvulas izquierdas por bacilos gran negativos: epidemiología y características clínicas.** 4. ed. [S.l.; s.n.] Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011.

ORSI, G. B.; FALCONE, M.; VENDITTI, M. **Surveillance and management of multidrug-resistant microorganisms.** [S.l.; s.n.] Expert Rev Anti Infect Ther. 2011.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. **Biofilm formation as microbial development.** 54. ed. [S.l.; s.n.] Annu. Rev. Microbiol. 2000.

PANT, S.; PATEL, N. J.; DESHMUKH, A. et al. **Trends in infective endocarditis incidence, microbiology, and valve replacement in the United States from 2000 to 2011.** [S.l.; s.n.] J Am Coll Cardiol. 2015.

PAZDERNIKA, M.; KAUTZNER, J.; SOCHMAN, J. et al. **Clinical manifestations of infective endocarditis in relation to infectious agents: An 8-year retrospective study.** 2. ed. Olomouc, Czech Repub. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky. Jun 2016.

PELLETIER, L. L.; PETERSDORF, R. G. **Infective endocarditis: a review of 125 cases from the University of Washington Hospitals, 1963-72.** Washington. [s.n.] Medicine 1977.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. ***Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.** [S.l.; s.n.] Clin Microbiol Rev. 1998.

RAZA, S. S.; SULTAN, O. W.; SOHAIL, M. R. **Gram-negative bacterial endocarditis in adults: state-of-the-heart.** [S.l.; s.n.] 8. ed. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2010.

REGUE', M.; CLIMENT, N.; ABITIÚ, N. et al. **Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* waa gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis.** [S.l.; s.n.] J. Bacteriol. 2001.

REGUE', M.; HITA, B.; PIQUE', N. et al. **A Gene, *uge*, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence.** 1. ed. [S.l.; s.n.] Infection and immunity. Jan 2004.

REMYA P.; SHANTHI M.; SEKAR U. **Occurrence and characterization of hyperviscous K1 and K2 serotype in *Klebsiella pneumoniae*.** 3. ed. [S.l.; s.n.] J Lab Physicians. 2018.

REN, Z.; JIN, H.; MORTON, D. J.; STULL, T. L. ***hgpB*, a gene encoding a second *Haemophilus influenzae* hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding protein.** 10. ed. [S.l.; s.n.] Infect Immun. Oct 1998.

REYES, M. P.; REYES, K. C. **Gram-negative endocarditis.** 4. ed. Curr. Infect. Dis. Rep. 2008.

RIBEIRO, S. M.; FUENTE-NÚ-EZ, C. D.; BAQUIR, B. et al. **Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to β -lactam antibiotics.** [S.l.; s.n.] Antimicrob. Agents. Chemother. 2015.

ROBERTS, J. A.; BRITT-INGER, M.; ILVER, D. et al. **The Gal(al-4)Gal-specific tip adhesion of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract.** [S.l.; s.n.]. Proc. Natl.Acad. Sci.U.S.A. 1994.

ROSA, A. C. P; MARIANO, A. T.; PEREIRA, A. M. S. et al. **Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil.** 9. ed. [S.I;s.n.] Journal of Medical Microbiology. Sep. 1998.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. **Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC.** [S.l.; s.n.] J Infect Dis. 2000.

SALDANA, Z.; DE LA CRUZ, M. A.; CARRILLO-CASAS, E. M. et al. **Production of the *Escherichia coli* common pilus by Uropathogenic *E. coli* is associated with adherence to HeLa and HTB-4 cells and invasion of mouse bladder urothelium.** [S.l; s.n.] Plos One. 2014.

SATLIN, M. J.; JENKINS, S. G.; WALSH, T. J. **The global challenge of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in transplant recipients and patients with hematologic malignancies.** [S.l.; s.n.] Clin Infect Dis. 2014.

SATO, Y.; UNNO, Y.; KAWAKAMI, S. et al. **Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps.** [S.l.; s.n.] J Med Microbiol. 2017.

SCHRAMM, G. E.; JOHNSON, J. A.; DOHERTY, J. A., et al. **Increasing incidence of sterile-site infections due to non-multidrug-resistant, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospitalized patients.** [S.l.; s.n.] Infect Control Hosp Epidemiol. 2007.

SCHROLL, C.; BARKEN, K. B.; KROGFELT, K. A. et al. **Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation.** [S.l.; s.n.] BMC Microbiol. 2010.

SECKELER, M. D.; HOKE, T. R. **The worldwide epidemiology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease.** 3. ed. [S.l.; s.n.] Clin Epidemiol. 2011.

SERRA, D. O.; RICHTER, A. M.; HENGGE, R. **Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms.** [S.l.; s.n.] J. Bacteriol. 2013.

SHEIK, J., HICKS, S., DALL'AGNOL, M. et al. **Roles for *Fis* and *YafK* in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*.** Mol Microbiol. [S.l.; s.n.]. 2001.

SHON A. S., BAJWA R. P., RUSSO T. A. **Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed.** 2. ed. [S.l.; s.n.] Virulence. 2013.

SLIPCZUK, L.; CODOLOSA, J. N.; DAVILA, C. D. et al. **Infective endocarditis epidemiology over five decades: a systematic review.** 8. ed. [S.l.; s.n.] PLoS One. 2013.

SNYDER, N.; ATTERBURY, C. E.; CORREIA, J. P. et al **Increased occurrence of cirrhosis and bacterial endocarditis.** [S.l.; s.n.] Gastroenterology. 1977.

SRINIVAS, K. H.; SHARMA, R.; AGRAWAL, N. et al. **Silent destruction of aortic and mitral valve by *Klebsiella pneumoniae* endocarditis.** [S.l.; s.n.] BMJ Case Rep. 2013.

SY, R. W.; CHAWANTANPIPAT, C.; RICHMOND, D. R. et al. **Development and validation of a time-dependent risk model for predicting mortality in infective endocarditis.** 16. ed. [S.l.; s.n.] Eur Heart J. Aug 2011.

TACCONELLI, E.; CATALDO, M. A.; DANCER, S. J. et al. **Guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients.** [S.l.] European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. ESCMID Clin Microbiol Infect 2014.

TARTOF, S. Y.; SOLBERG, O. D.; MANGES, A. R. et al. **Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing.** 12. ed. [S.l.; s.n.] J Clin Microbiol. 2005.

TERLIZZI, M. E.; GRIBAUDO, G.; MAFFEI, M. E. **UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections:** Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non- antibiotic antimicrobial strategies. 8. ed. [S.I.: s.n.] Front. Microbiol. 2017.

TERPENNING, M. S.; BUGGY, B. P.; KAUFFMAN, C. A. **Hospital-acquired infective endocarditis.** [S.I.; s.n.] Arch Intern Med. 1988.

THUNY, F.; HABIB, G.. **When should we operate on patients with acute infective endocarditis?** 11. ed. [S.I.; s.n.] Heart. Jun 2010.

THUNY, F.; GRISOLI, D.; COLLART, F. et al. **Management of infective endocarditis:** challenges and perspectives. [S. l.; s.n.].Lancet. 2012.

TLEYJEH, I. M.; BADDOUR, L. M. **The Potential Impact of Survivor Treatment Selection Bias on the Perceived Efficacy of Valve Surgery in the Treatment of Infective Endocarditis.** 10. ed. [S.I.; s.n.] Clin Infect Dis. May 2007.

TOTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE L. C. **Microbiology.** 6. ed. [S.I.] Artmed editora. 2000.

TSAI, K.; HONG-THIH, L.; TZUNG-CHIEH, T. et al. **Difference in the regulation of IL-8 expression induced by uropathogenic *E. coli* between two kinds of urinary tract epithelial cells.** [S.I.: s.n.] Journal of Biomedical Science. 2009.

TSUTSUMI, T.; HIRAOKA, E.; KANAZAWA, K. et al. **Diagnosis of *E. coli* tricuspid valve endocarditis:** a case report. Hawaii. [s.n.] Hawaii Med J. 2010.

TURNER, S. M.; SCOTT-TUCKER, C. L. M.; HENDERSON, I. R. **Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*.** 1. ed. [S.I.: s.n.]. Microbiol Lett. Out 2006.

VON REYN, C. F.; ARBEIT, R. D. **Case Definitions for Infective Endocarditis.** 3. ed. Lebanon, New Hampshire; Boston, Massachusetts. Elsevier. Am J Med. Mar.1994.

WANG, A.; ATHAN, E.; PAPPAS, P. A. et al. **Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis:** International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study Investigators. 12. ed. [S.I.; s.n.] JAMA. Mar2007.

WAGENLEHNER, F. M.; NABER, K. G.; WEIDNER, W. **Rational antibiotic therapy of urinary tract infections.** 10. ed. Med Monatsschr Pharm. [S.I.: s.n.] 2008.

WU, M. C.; LIN, T. L.; HSIEH, P. F.; et al. **Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess.** [S.I.; s.n.] PLoS ONE. 2011.

WU, X. R.; SUN, T. T.; MEDINA, J. J. **In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib:** Relation to urinary tract infections. 18. ed.[S.I.; s.n.] Proc Natl Acad Sci USA. 1996.

YANG, F.; ZHANG, B.; YU, J. et al. **Epidemiology and the prognosis of healthcare-associated infective endocarditis in China: the significance of non-nosocomial acquisition.** 4. ed. China. [s.n.] Emerging Microbes and Infections. 2015.

YONG, M. S.; COFFEY, S.; PRENDERGAST, B. D. et al. **Surgical management of tricuspid valve endocarditis in the current era: A review.** [S.l.; s.n.] Int J Cardiol. 2016.

ZANKARI, E.; HASMAN, H.; COSENTINO, S. et al. **Identification of acquired antimicrobial resistance genes.** J Antimicrob Chemoter. [S.l., s.n.]. 2012.

ZHANEL, G. G.; WALKTY, A. J.; KARLOWSKY, J. A. **Fosfomicin: A First-Line Oral Therapy for Acute Uncomplicated Cystitis.** [S.l.; s.n.] Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2016.

ZHENG, J. X.; LIN, Z. W.; CHEN C. et al. **Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of wcaG.** 8. ed. [S.l.; s.n.] Front Cell Infect Microbiol. Feb 2018.

ZHOU, K.; FERDIUS, M.; DE BOER, R. F. et al. **The mosaic genome structure and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 is driven by short-term adaptation.** 21. ed. [S.l.; s.n.] Clin Microbiol Infect. 2014.