SILVIO MARCIANO DA SILVA JUNIOR

**Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas
de crianças com infecção urinária.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidade em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT
para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2012

SILVIO MARCIANO DA SILVA JUNIOR

**Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas
de crianças com infecção urinária.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT
para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Marta de Oliveira Domingos

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva Junior, Silvio Marciano da.

Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de crianças com infecção urinária / Silvio Marciano da Silva Junior. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Marta de Oliveira Domingos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: *E. coli* uropatogênicas

Versão do título para o inglês: Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary infection.

1. *Escherichia coli* uropatogênica 2. Infecção do trato urinário 3. UPEC 4. Crianças I. Domingos, Marta de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB033/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Silvio Marciano da Silva Junior.

Título da Dissertação: Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de crianças com infecção urinária .

Orientador(a): Marta de Oliveira Domingos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Certificado da Comição de Ética

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
HOSPITAL INFANTIL DARCY VARGAS
Rua Seráfico de Assis Carvalho, n.º 34 - Morumbi
São Paulo - SP - CEP : 05614-040 - Fone: (11) 3723 - 3700
E-mail: hidv-dtds.expediente@saude.sp.gov.br

PARECER OFICIAL DA INSTITUIÇÃO

Do: Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Darcy Vargas

Para: MARTA DE OLIVIERA DOMINGOS

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Darcy Vargas, analisou e aprovou a pesquisa **"CARACTERIZAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI UROPATOGÊNICA ISOLADAS EM CRIANÇAS COM INFECÇÃO URINÁRIA"** sob responsabilidade de **MARTA DE OLIVIERA DOMINGOS** e cadastrado sob o número **CAAE 0005.0.350.3500-08**.

A referida pesquisa deverá ter acompanhamento desta CEP quanto à sua execução e finalização, segundo Resolução 196/96 e Resoluções Complementares CONEP/CNS/MS.

São Paulo, 14 de outubro de 2008.

Prof.º Dr. Rubens Feferbaum
Presidente - Comitê de Ética em Pesquisa
UGA III - Hospital Infantil Darcy Vargas

Eu dedico este trabalho as 3 mulheres da minha vida. Verônica minha esposa, sem ela eu não teria conseguido. E as minhas 2 filhas Manuela e Vitória, minhas gêmeas, as bebês mais lindas do mundo, elas são a inspiração da minha vida.

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer a Verônica por todo apoio e ajuda em toda a minha vida. E as minhas filhas Manuela e Vitória por existirem e me darem força com seus sorrisos.

A minha orientadora por ter me ajudado durante o percurso todo e principalmente no final do trabalho.

A Dra Roxane Piazza e ao Dr Osvaldo Sant'Anna pelo apoio e amizade

A todos os colegas do Laboratório de Bacteriologia por todo o período que passamos juntos.

Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia pela ajuda quando precisei.

Aos funcionários da secretária de pós por todo simpatia e vontade de ajudar a resolver os problemas durante todo o meu mestrado.

A Diretora da Bibliotecárias do ICB, Maria do Socorro, por ter me ajudado para que fosse possível ocorrer o depósito da dissertação.

E agradecer a CAPES pela bolsa que me ofereceu durante o mestrado.

RESUMO

SILVA JR, S. M. **Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de crianças com infecção urinária.** f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Infecção do Trato Urinário (ITU) é o segundo tipo de infecção bacteriana mais comum em crianças. Nesse estudo amostras de urina de 6012 pacientes pediátricos foram analisadas, a prevalência de ITU foi determinada, os uropatógenos foram identificados e o perfil antimicrobiano dos mesmos foi determinado. Os resultados mostraram que a prevalência de ITU varia de acordo com o sexo e a idade do paciente. Bactérias Gram-negativas foram responsáveis por 89% de todos os casos de ITU e *Escherichia coli* foi a espécie mais prevalente. Os uropatógenos foram resistentes a ampicilina 63 %, a nitrofurantoina 37 % e ao trimethoprim-sulfamethoxazol 28 %. Todavia, 99 % deles foram sensíveis a cefalexina e 96 % ao cloranfenicol. Resultados obtidos com a caracterização de 90 isolados de *E. coli*, mostraram que todas as amostras foram positivas para os marcadores *fimA* e *fimH*, 53% para *pap*, 32% para *sfa*, 10% para o marcador genético da toxina *pic* e 29 % foram capazes de produzir hemolisina- α . Esses isolados se distribuíram entre os grupos filogenéticos da seguinte maneira: B2 42%, D 25%, A 21% e B1 11%. Dessas amostras 19 % não foram tipáveis (ONT), 15,56 % pertenceram ao sorogrupo O2 e 12,22 % aos sorogrupos O6 e OR. A maioria dos isolados de *E. coli* aderiu às células epiteliais, poliestireno e PVC.

Palavras-chaves: *Escherichia coli* uropatogênica, Infecção do trato urinário, UPEC, Crianças.

ABSTRACT

SILVA JR, S. M. **Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de crianças com infecção urinária.** f. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Urinary Tract Infection (UTI) is the second most common type of bacterial infection in children. In this study, 6012 urine samples from pediatric patients were analyzed, the prevalence of UTI was determined, the uropathogens were identified and their antimicrobial profile was determined. The results have shown that the prevalence of UTI varies according to the sex and age of the patient. Gram negative bacteria were responsible for 89 % of all cases of UTI and *E. coli* was the most prevalent species. The uropathogens were resistant to: ampicillin 63 %, nitrofurantoin 37 % and trimethoprim-sulfamethoxazole 28 %. However, 99 % of them were sensitive to cephalexin and 96 % to chloramphenicol. Results obtained with the characterization of 90 isolates of *E. coli* showed that all of them were positive for *fimA* and *fimH*, 53 % were positive for *pap*, 32 % were positive for *sfa*, 10 % were positive for the genetic marker of *pic* and 29 % were able to produce hemolysin- α . These isolates were distributed between the phylogenetic groups as follows: B2 42 %, D 25 %, A 21 % and B1 11 %. Nineteen percent of these samples were untypeable (ONT), 15.56 % belonged to O2 serogroup and 12.22 % belonged to the O6 and OR serogroups. Most *E. coli* isolates were able to adhere to epithelial cells, polystyrene and PVC.

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli*, Urinary tract infections, UPEC, Children.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
11.1 Infecção do Trato Urinário (ITU)	10
1.2 Classificação Clínica da ITU	11
1.3 Agentes Etiológicos	11
1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	12
1.3.2 <i>Escherichia coli</i> uropatogênica	15
1.4 Resistência de uropatógenos a agentes antimicrobianos	16
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Pacientes	20
3.1.1 Pacientes com quadro clínico de ITU	20
3.1.2 Coleta das amostras de urina	21
3.2 Identificação dos agentes etiológicos responsáveis pelos quadros clínicos de ITU	21
3.3 Antibiograma	21
3.4 Caracterização das <i>E. coli</i> isoladas de urina de pacientes com ITU	22
3.4.1 Quadro clínico dos 90 pacientes cujas amostras de urina positivas para <i>E. coli</i> foram utilizadas para caracterização	24
3.4.2 Sorotipagem.	24
3.4.2.1 Caracterização dos antígenos somáticos (O)	24
3.4.2.2 Caracterização dos antígenos flagelares (H)	25
3.4.3. Preparo dos lisados e condições das reações de PCR (Polimerase Chain Reaction)	26
3.4.4 Verificação da produção de Hemolisina- α	26
3.4.5. Teste de adesão celular	27
3.4.5.1 Linhagem celular.	27
3.4.5.2 Teste de adesão em linhagem celular Vero.	27
3.4.6 Adesão a superfícies abióticas (formação de biofilme: método indireto)	28
3.5 Análises Estatísticas	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Prevalência de Infecção urinária em pacientes pediátricos	31
4.2 Identificação e prevalência dos agentes etiológicos encontrados nas urinas dos pacientes pediátricos com quadro clínico de ITU	36
4.3 Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas da urina de pacientes pediátricos	41
4.4 Caracterização das <i>Escherichia coli</i> isoladas da urina de pacientes pediátricos	46
4.4.1 Quadro clínico dos pacientes com ITU	46
4.4.2 Filogênia	47
4.4.3 Perfil de virulência	51
4.4.4 Perfil de resistência das amostras	58
4.4.5 Sorotipagem	62
4.4.6 Adesão a células Vero	66
4.4.7 Ensaio de formação de biofilme em superfícies abióticas: método indireto	69
5 Conclusão	74
Referências	75
Apêndices	84
Anexos	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecção do Trato Urinário (ITU)

Infecção do trato urinário (ITU) é definida pela colonização de microrganismos em qualquer órgão do trato urinário, da uretra ao rim (MARANGONI; MOREIRA, 1994). Estima-se que esse tipo de infecção afete cerca de 150 milhões de pessoas por ano em âmbito global, gerando um custo com tratamento de saúde maior que seis bilhões de dólares (STAMM; NORRBY, 2001).

Apesar da ITU ser um problema de saúde de ordem pública, econômica e social elevada, a incidência dessa infecção no Brasil é difícil de ser estimada, por não se enquadrar no grupo de notificação obrigatória do Serviço de Saúde Pública (FOXMAN, 2002; BRASIL, Ministério da Saúde, 2006). Todavia, dados levantados através de estudos feitos sobre a prevalência dessa infecção na população indicaram que a ITU é a infecção bacteriana de maior ocorrência na clínica médica e afeta principalmente mulheres. Somente nos EUA cerca de 60% das mulheres contraem ITU pelo menos uma vez na vida, sendo que, 11% apresentam ITU anualmente (FOXMAN et al., 2000; 2002). Ainda nos EUA são realizadas oito milhões de visitas anuais ao consultório médico referentes apenas à ITU crônica, o que faz dessa infecção um problema clínico economicamente significativo (BOWER et al., 2005). No Brasil, aproximadamente 50 a 70% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de ITU durante a vida, e dentre estas 20 a 30% tem episódios recorrentes (GUPTA et al., 2001). Apesar da prevalência encontrada em mulheres, ITU é após a respiratória, a infecção que mais afeta crianças. Ela ocorre principalmente nos primeiros anos de vida em ambos os sexos (de 0 à 4 anos), porém tem um grande aumento durante a adolescência no sexo feminino (GUIDONI; TOPOROVSKI, 2001; WINBERG et al., 1974). Apesar da taxa de mortalidade por ITU ser próxima a zero, as consequências deste tipo de infecção em longo prazo podem ser graves como: o surgimento de cicatrizes renais, hipertensão arterial, deterioração da função renal e até mesmo complicações na gestação. Além disso, a combinação de infecções recorrentes ou pielonefrite com má-formação do trato urinário ou disfunção miccional aumentam a chance de um dano renal (KOCH; ZUCCOLOTTO, 2001; RIYUZO et al., 2007).

1.2 Classificação clínica da ITU

A ITU pode ser classificada como complicada e sem complicação (FOXMAN, 2002; HEILBERG; SCHOR, 2003). As ITUs complicadas ocorrem em pacientes com anormalidades anatomofuncionais, obstruções do trato urinário, problemas metabólicos, pacientes transplantados, bem como quando estas foram adquiridas no ambiente hospitalar ou devido a necessidade do uso de instrumentos médicos como cateteres. As ITUs caracterizadas como sem complicações são aquelas adquiridas fora do ambiente hospitalar por pacientes com estrutura e função normal do trato urinário (ARSLAN et al; 2005; HEILBERG; SCHOR, 2003; HOOTON; STAMM, 1997). Todavia, em ambos os tipos de ITU, o paciente tem grande chance de ter uma infecção recorrente poucas semanas ou meses após a ITU inicial. Isso ocorre principalmente em mulheres, sendo que muitas delas apresentam ITU recorrente e problemas adicionais como cicatrizes renais e aumento do risco de desenvolver câncer de bexiga (FOXMAN, 2002; KANTOR et al., 1984; YAMAMOTO et al., 1995).

As infecções do trato urinário são classificadas como: inferior (cistite – infecção na bexiga) e superior (pielonefrite – infecção do rim) (ANDERSON et al., 2004). Os sintomas da cistite são relativamente moderados, incluindo necessidade freqüente ou urgente de urinar e dor no baixo ventre. A pielonefrite tem sintomas mais graves como: dor na parte inferior das costas, febre, náusea e vômitos. Além disso, a pielonefrite pode gerar complicações como bacteremias (em cerca de 30% dos casos) podendo evoluir para sepse (ANDERSON et al., 2004; HEILBERG; SCHOR, 2003; MCBEAN; RAJAMANI, 2001; SIEGMAN-IGRA et al., 2002).

1.3 Agentes etiológicos

Várias bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* ssp., *Citrobacter* ssp., *Enterobacter* ssp., *Acinetobacter* ssp., *Proteus* ssp., *Pseudomonas* ssp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* podem ser responsáveis por infecções do trato urinário. Algumas leveduras, principalmente *Candida albicans*, também podem causar infecção urinária (FALCÃO et al., 2000; HEILBERG; SCHOR, 2003).

Com exceção de *E. coli*, a incidência na população de outros agentes etiológicos responsáveis por infecção urinária é baixa. Por exemplo, estudos realizados no Brasil em Brasília, Goiânia, Ribeirão Preto e São Paulo mostraram a seguinte prevalência: 2 a 9% *Proteus* ssp., 3% *Pseudomonas* ssp.; 1 a 3 %

Enterobacter ssp., 1 a 6% *Klebsiella* ssp., 1 a 20% *Staphylococcus* ssp, e 1 a 5% leveduras (FALCÃO et al., 2000; NETO et al., 2003; PIRES et al., 2007; POLETTO; REIS, 2005). Todavia, na Turquia foi demonstrado que a prevalência desses agentes etiológicos é menor do que 2% (ARSLAN et al., 2005; YÜKSEL et al., 2006). No entanto, no caso de ITU nosocomiais, *P. aeruginosa* é em âmbito global o principal agente etiológico. *E. coli*, por sua vez, é a bactéria mais comumente isolada em ITU comunitária, sendo que dependendo da população estudada sua prevalência varia entre 55 a 90% (ANDERSON et al., 2004; ARSLAN et al., 2005; FALCÃO et al., 2000; FOXMAN, 2002; KANTOR et al., 1984; MCBEAN; RAJAMANI 2001; NETO et al., 2003; PIRES et al., 2007; POLETTO; REIS, 2005; SIEGMAN-IGRA et al., 2002; YAMAMOTO et al., 1995; YÜKSEL et al., 2006). Por exemplo, na Turquia, *E. coli* é o agente causador de 90% das ITU sem complicações e de 78% das ITU com complicações (ARSLAN et al., 2005). Já nos EUA, *E. coli* é isolada entre 70 e 95% dos casos de ITU comunitária e em 50% dos casos de ITU nosocomial (FOXMAN, 2002; HOOTON; STAMM, 1997; SADLER et al., 1989; SVANBORG; GODALY, 1997). No Brasil, estudos realizados em pacientes ambulatoriais em Goiânia no ano de 2003, mostraram que a prevalência de *E. coli* nesses pacientes foi de 67,9% (POLLETO; REIS, 2005). No Hospital Universitário de Brasília no período de 2001 a 2005, *E. coli* foi encontrada em 62,4% das ITU (PIRES et al., 2007). Em 2003, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 58,4% dos isolados de ITU eram *E. coli* (NETO et al., 2003).

1.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo que pode ser encontrado no meio ambiente e na microbiota intestinal normal do homem e de outros animais, onde mantém uma relação comensal de benefício mútuo com o hospedeiro. Porém, mesmo *E. coli* comensais podem se tornar patogênicas, quando houver uma quebra no equilíbrio da relação com o hospedeiro (p. e. pacientes debilitados ou lesões teciduais) ou quando a bactéria estiver fora do trato gastrointestinal, ou seja, em outras partes do organismo. A transmissão horizontal de genes de virulência provenientes de outras bactérias patogênicas também pode ser responsável pela transformação de *E. coli* comensais em cepas patogênicas (KAPER et al., 2004).

Além das *E. coli* comensais, existem também *E. coli* patogênicas que são capazes de causar infecções em indivíduos sadios por possuírem uma combinação muito bem sucedida de fatores de

virulência, adquiridos durante a evolução que as transformaram em “PATÓTIPOS” específicos de *E. coli* (KAPER et al., 2004).

As *E. coli* patogênicas podem ser classificadas em *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000). As ExPEC podem ser subdivididas nos seguintes grupos: *E. coli* responsáveis por infecção urinária, denominadas de UPEC (*E. coli* uropatogênica), as que causam meningite, denominadas de MNEC (*E. coli* associada à meningite) e as causadoras de sepse, denominadas de SEPEC (*E. coli* associada à sepse) (KAPER et al., 2004). Entre as *E. coli* intestinais que causam diarreia existem seis categorias bem definidas que são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004).

Análises filogenéticas demonstraram que as *E. coli* pertencem a quatro grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D). Estes grupos foram definidos com base em árvores filogenéticas geradas através das técnicas de MLEE (“multilocus enzyme electrophoresis”) e ribotipagem (HERZER et al., 1990; SELANDER et al., 1986). Com base nestes resultados, Clermont et al. (2000) desenvolveram um método mais simples, baseado em PCR (Triplex PCR), para identificação rápida dos grupos filogenéticos de *E. coli*. Esse método é baseado na presença ou ausência dos seguintes genes: *chuA* (responsável pelo transporte do grupo heme no sistema de aquisição de ferro de EHEC O157:H7), *yjaA* (cuja função ainda não foi descrita) e um fragmento de DNA denominado TspE4.C2. O grupo A é caracterizado pela ausência do gene *chuA* e do fragmento TspE4.C2. O grupo B1 é caracterizado pela ausência do gene *chuA* e pela presença do fragmento TSE4.C2. O grupo B2 é caracterizado pela presença dos genes *chuA* e *yjaA*. O grupo D por sua vez é caracterizado pela presença do gene *chuA* e ausência de *yjaA* (figura 1).

Figura 1- Grupos filogenéticos de *E. coli*: B2 [*chuA* (+) e *yjaA* (+)], D [*chuA* (+) e *yjaA* (-)], B1 [*chuA* (-) e TSPE4.C2 (+)] e A [*chuA* (-) e TSPE4.C2 (-)].

Fonte: (CLERMONT et al., 2002).

As *E. coli* se distribuem entre os 4 principais grupos filogenéticos da seguinte maneira: as comensais predominam no grupo A aparecendo em menor número no grupo B1. As *E. coli* patogênicas extra-intestinais aparecem em sua maioria nos grupos B2 e D, e as *E. coli* patogênicas intestinais aparecem bem distribuídas entre todos os 4 grandes grupos (BINGEN et al., 1998; PUPO et al., 1997).

Foi observado que a distribuição dos grupos filogenéticos de *E. coli* na microbiota intestinal varia geograficamente de acordo com a população analisada e fatores sócio-econômicos como hábitos alimentares e higiene (TENAILLON et al., 2010). Mesmo assim, foi constatado que a maior parte das *E. coli* uropatogênicas se encontra no grupo filogenético B2 onde predominam as bactérias extra-intestinais com maior número de fatores de virulência (BUKH et al., 2009; CLERMONT et al., 2000; PICARD et al., 1999).

1.3.2 *Escherichia coli* Uropatogênica

A grande variabilidade genética encontrada entre as cepas de UPEC não permite que as mesmas sejam agrupadas em categorias distintas como acontece no caso de *E. coli* diarreio gênicas (BOWER et al., 2005; LLOYD et al., 2007). Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar a origem dessa diversidade. Uma delas preconiza que um grupo de *E. coli* comensais intestinais passa para o trato urinário causando a infecção, estas bactérias comensais teriam recebidos genes de virulência de APEC (*E. coli* Patogênica Aviária), tornando-se assim capazes de causar a infecção no trato urinário, uma vez que as UPEC e APEC possuem um perfil muito semelhante de genes de virulência (WILES et al., 2008). Outra hipótese tem como base a transformação de bactérias diarreio gênicas em uropatogênicas através da transmissão horizontal de genes de virulência (ABE et al., 2008; KAPER et al., 2004).

Através dos fatores de virulência, algumas cepas de UPEC podem invadir as células epiteliais do hospedeiro e produzir um biofilme intracelular que confere proteção em relação ao ataque do sistema imune e tratamento com antibióticos por longos períodos. Essa propriedade das UPECs pode explicar a natureza enigmática da infecção crônica e recorrente da ITU (ANDERSON et al., 2004; BOWER et al., 2005; KAPER et al., 2004;).

Os fatores de virulência mais comumente associados às UPEC são: adesinas específicas, como fimbria P (Pap), fimbria tipo 1 (associada com adesina FimH), fimbria S, outras adesinas não fimbriais (como Afa/Dr, F1C, M) e toxinas secretadas como: Vat, Sat, Pic, CNF-1, Hemolisina- α , formação de cápsula de polissacarídeos para imunoevasão, e recombinases de mudança de fase (JOHNSON, 1991; KAPER et al., 2004; RUSSO; JOHNSON et al., 2000).

A fimbria Tipo 1 é um importante fator de virulência encontrado em UPEC e em outras *Enterobacteriaceae*. Ela possui afinidade a oligossacarídeos do tipo manose (KROGFELT et al., 1990) e em UPEC é essencial para a adesão ao epitélio do trato urinário (CHEN et al., 2009). Essa fimbria é constituída por um filamento protéico de aproximadamente 5 nm de espessura e 1 a 2 μ m de comprimento, codificado pelo operon *fim*, composto pelos genes: *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG*, *fimH* e *fimL* (MOL; OUDEGA, 1996), responsáveis pela expressão e montagem do filamento via chaperonina-usher. (HULTGREN et al., 1991). A proteína codificada pelo gene *fimA* corresponde a maior subunidade fimbrial, enquanto o gene *fimH* codifica a menor subunidade da fimbria, presente na extremidade da estrutura fimbrial e responsável pela sua aderência (CHEN et al., 2009).

A Hemolisina- α também é considerada um dos principais fatores de virulência encontrado em UPEC. Essa toxina é membro da família de toxinas que se repetem (repeats-in-toxin – RTX-family) sendo inicialmente isolada em UPEC J96 (KAPER, et al., 2004; WELCH, 1991). Ela é dependente de cálcio, formadora de poro e uma das principais toxinas responsáveis pela obtenção de ferro para a bactéria durante o processo infeccioso.

A diversidade das UPECs é tão elevada que este grupo de bactérias pode carregar genes de virulência específicos de *E. coli* diarreio gênicas como, por exemplo o gene que codifica a proteína Pic (“protein involved in intestinal colonization”). A proteína Pic pertencente ao grupo das SPATES (Serine Protease Autotransporters) (DAUTIN, 2010; HENDERSON et al., 1999).

Apesar da grande diversidade de cepas encontradas em UPEC, alguns métodos tradicionais como a determinação de sorogrupos (antígenos somáticos O) são utilizados para a classificação das mesmas. Atualmente 181 sorogrupos de *E. coli* já foram descritos, dentre estes, 10 sorogrupos (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 e O75) são os mais encontrados em infecções do trato urinário (JOHNSON, 1991; ORSKOV et al., 1982; BIDEET et al., 2007; LLOYD et al., 2007).

1.4 Resistência de uropatógenos a agentes antimicrobianos.

O tratamento utilizado em casos de infecção urinária é feito através do uso de diferentes tipos de agentes antimicrobianos. Eles podem ser administrados pela via oral ou parenteral. Pela via oral os antimicrobianos mais utilizados são os seguintes: sulfametoxazol, trimetoprim, amoxilina, ácido naxilínico, ácido pipemídico, cefalexina, ciprofloxacina, norfloxacina ou nitrofurantoina (HEILBERG; SCHOR, 2003).

Os agentes antimicrobianos acima citados pertencem a diferentes classes que são categorizadas de acordo com o modo de ação, estrutura química e atividade do agente antimicrobiano. De acordo com Trabulsi e Alterthum (2004) os agentes antimicrobianos são classificados da seguinte maneira:

- a) aminoglicosídeos: (amicacina, gentamicina);
- b) β -Lactâmicos: penicilinas (ampicilina), penicilina + inibidor de β -lactamase (piperacilina/tazobactam), cefalosporinas de primeira (cefalexina), segunda (cefoxitina), terceira geração (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona), Monobactâmicos (aztreonam), Carbapenêmicos (imipenem, meropenem);
- c) Derivados imidazólicos (nitrofurantoína);

- d) quinolonas (ácido nalidíxico e ciproflaxina); Fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina);
- e) anfenicóis (cloranfenicol);
- f) sulfonamidas (sulfametaxol).

Os aminoglicosídeos são antibióticos que inibem a síntese de proteínas bacterianas, ao se ligarem a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo assim a leitura correta do RNA mensageiro e consequentemente a síntese de proteínas. A resistência de algumas bactérias a aminoglicosídeos é devida à existência de enzimas bacterianas que inativam esses antibióticos. Os genes que codificam essas enzimas são transmitidos de bactérias resistentes para bactérias ainda susceptíveis através de recombinação, troca de plasmídeos ou transposons de DNA.

Todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenênicos e monobactâmicos) atuam interferindo na síntese de peptidoglicanos inibindo a transpeptidação que ancora o peptidoglicano em forma estrutural rígida em volta da bactéria. Sendo o interior da célula bacteriana hiperosmótico, sem uma parede rígida há afluxo de água do exterior e a bactéria é rompida (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

As cefalosporinas são agrupadas em "gerações" por suas características antimicrobianas. As primeiras cefalosporinas foram agrupadas na "primeira geração" enquanto mais adiante, cefalosporinas de amplo espectro foram classificadas como cefalosporinas de segunda geração. Cada nova geração de cefalosporinas tem mais potência frente a bactérias gram-negativas e características antimicrobianas perceptivelmente maiores que a geração precedente. O mecanismo de resistência bacteriana às penicilinas e cefalosporinas, baseia-se na produção de enzimas bacterianas denominadas β -lactamases que degradam esses antibióticos antes de sua atuação. Essa resistência em algumas cepas bacterianas é transferida através da disseminação de plasmídeos que codificam o gene da proteína beta-lactamase, que destrói o antibiótico antes da atuação do mesmo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Os antimicrobianos carbapenênicos também são um grupo de antibióticos beta-lactâmicos com a diferença de que o átomo de enxofre no anel tiazolidínico da molécula de penicilina é substituído por um átomo de carbono (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A maior parte dos derivados imidazólicos são agentes fungicidas e atuam interferindo no metabolismo do lanosterol, levando a uma diminuição do ergosterol e acúmulo de esterol que culmina na alteração da permeabilidade das membranas dos fungos. Porém alguns derivados imidazólicos como a

nitrofurantoína são agente antibacterianos, utilizados principalmente no tratamento de infecções urinárias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

As sulfonamidas agem inibindo a síntese de DNA na etapa da biossíntese do ácido fólico e as quinolonas atuam inibindo a síntese de DNA bloqueando a ação das girases. As fluoroquinolonas são um grupo de quinolonas com pelo menos um átomo de flúor e um grupo piperazínica (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Tem sido observado nos últimos anos um crescente aumento da resistência de uropatógenos a diversas classes de antimicrobianos. Em diversas cidades brasileiras bactérias isoladas de amostras de urina de pacientes adultos com quadro de infecção urinária demonstraram uma alta resistência às sulfonamidas. (POLETTO; REIS, 2005; PIRES, et al., 2007; EPARIS, et al., 2006). Ainda no Brasil e em alguns países como a Grécia e a Turquia foi verificado um aumento na resistência às quinolonas e fluoroquinolonas (ENA et al., 1995; ZERVOS et al., 2003; GOETTSCHE et al., 2000; KARLOWSKY et al., 2002). Além disso, um estudo realizado em adultos nos Estados Unidos mostrou que os uropatógenos analisados foram em geral resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados, sendo que em pacientes idosos, eles tenderam a ser multi-resistentes (KARLOWSKY et al., 2001). A atual situação de resistência bacteriana a agentes antimicrobianos em grande parte é devida ao uso indiscriminado de antibióticos pela população sem o aconselhamento médico (KARLOWSKY et al., 2001). Como medida para prevenir a emergência de patógenos multi resistentes mais adaptados a colonização do trato urinário, em 2010 o governo brasileiro obrigou a apresentação de receita médica para a aquisição de antibióticos. O surgimento de patógenos emergentes juntamente com o crescimento da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos são fatores que podem complicar significativamente o cuidado com os pacientes ao aumentarem o tempo de internação e a necessidade de esquemas terapêuticos mais caros e complexos. Essa situação é ainda mais grave na população infantil, onde as dificuldades de tratamento e evolução da doença tornam-se mais sérias. Por essa razão, estudos que determinem a prevalência, a caracterização e o perfil antimicrobiano de uropatógenos, tanto a nível regional quanto institucional são fundamentais para a otimização de práticas terapêuticas, principalmente em casos de urgência onde o tratamento deva ser iniciado de imediato sem o auxílio da urocultura ou do antibiograma que levam cerca de 48 horas para serem realizados.

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram determinar a prevalência e o perfil antimicrobiano de uropatógenos isolados de pacientes pediátricos admitidos em um Hospital Infantil de São Paulo, SP (setembro/2008 a agosto/2009) e caracterizar algumas amostras de *E. coli* uropatogênicas desses pacientes. Para isso foi determinada a filogenia, a presença de alguns fatores de virulência, o sorotipo, a adesão em células e a capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas dessas amostras. Esses dados foram relacionados com o quadro clínico dos pacientes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Neste estudo através do exame de urocultura foi determinada a presença de uropatógenos em amostras de urina de 6012 pacientes (2326 meninos e 3686 meninas) com idade entre 0 e 16 anos admitidos em um Hospital Infantil de São Paulo, durante o período de setembro de 2008 a agosto de 2009 (Figura 2). O critério de seleção utilizado para participação dos 6012 pacientes nesse trabalho foi baseado apenas no pedido de urocultura e antibiograma solicitados pelo hospital, independente dos sintomas clínicos do paciente.

Figura 2 – Número de amostras de urina analisadas de pacientes com ou sem ITU

Fonte: (SILVA JR, 2012).

3.1.1 Pacientes com quadro clínico de ITU

Foram considerados pacientes positivos para ITU aqueles cujas amostras de urina apresentaram um crescimento maior que 10^5 UFC/ mL após incubação por 24 h ou 48 h em meio ágar Cled ou ágar MacConkey. Das 6012 amostras analisadas 1021 foram consideradas positivas para ITU sendo 406 amostras provenientes de pacientes do sexo feminino e 615 do sexo masculino (Figura 2).

3.1.2 Coleta das amostras de urina

As amostras de urina analisadas nesse estudo foram coletadas em coletor universal estéril (jato médio) ou em sacos estéreis quando o paciente não tinha controle da micção. Antes da coleta foi feita a assepsia da região genital com gaze estéril umedecida em soro fisiológico também estéril. As amostras foram subsequentemente encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital.

3.2 Identificação dos agentes etiológicos responsáveis pelos quadros clínicos de ITU.

A identificação dos patógenos foi realizada apenas nos isolados da urina de pacientes positivos para ITU (N = 1021 pacientes). Os patógenos foram caracterizados pela coloração de Gram como pertencentes a 3 grupos: Gram positivos, Gram negativos e levedura. As amostras Gram negativas foram identificadas pelo crescimento no meio IAL (Instituto Adolf Lutz – Rugai Lisina modificado). As amostras Gram positivas foram identificadas pela reação de catalase, coagulase e crescimento em meio bile-esculina. As leveduras foram identificadas apenas pela coloração de Gram. A identificação dos patógenos foi realizada como parte da rotina laboratorial do Hospital. O aluno acompanhou todo o processo de rotina realizado no hospital durante o período de análise das amostras. Todos os dados foram compilados pelo aluno.

3.3 Antibiógrama

O antibiógrama foi realizado apenas nas amostras de bactérias Gram negativas provenientes da urina de pacientes com ITU. No caso, 907 amostras do total de 1021 analisadas foram determinadas como positivas para bactérias Gram negativas (Figura 3). O teste foi realizado pelo método de difusão de discos de acordo com a técnica de Kirby & Bauer (NCCLS, 2004). Foram utilizados discos comerciais dos seguintes antibióticos: aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina); β -lactâmicos – cefalosporinas de 1ª geração (cefalexina), de 2ª geração (cefotaxima), e de 3ª geração (ceftazidima, ceftriaxona), penicilinas (ampicilina), penicilinas+inibidor de β -lactamase (piperacilina/tazobactam); carbapenêmicos (imipenem, meropenem); derivados imidazólicos (nitrofurantoína); fluorquinolonas (ciprofloxacina,

levofloxacina, norfloxacina); monobactâmicos (aztreonam); anfenicóis (cloranfenicol); sulfonamidas (sulfazotrim). O antibiograma dos patógenos Gram negativos foi realizado como parte da rotina laboratorial do Hospital. O aluno acompanhou todo o processo de rotina realizado no hospital durante o período de análise das amostras. Todos os dados foram compilados pelo aluno.

3.4 Caracterização de *Escherichia coli* isoladas da urina de pacientes com ITU.

Sendo *E. coli* a espécie responsável pela maior parte dos casos de infecção urinária, caracterizamos 90 amostras de *E. coli* quanto a filogenia, presença de marcadores de virulência, sorotipo, capacidade de adesão a células epiteliais humanas, capacidade de formação de biofilme em poliestireno e PVC e expressão de hemolisina- α . O processo de seleção e caracterização das amostras de *E. coli* foi realizado da seguinte maneira: duzentas amostras de urina do total de 1021 amostras positivas para ITU foram escolhidas aleatoriamente (Figura 3). Dessas amostras 90 foram positivas para *E. coli*. Os noventa isolados de *E. coli* foram então utilizados para caracterização. Como descrito no item 3.2, a identificação desses isolados foi primeiramente determinada por crescimento em meio IAL feito como parte da rotina laboratorial do Hospital.

A identificação dessas amostras foi posteriormente confirmada pelos teste API20E (Biomérieux, Frances) realizados no laboratório de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz. A sorotipagem dessas amostras foi realizada como descrito no item 3.4.2 no laboratório de microbiologia do Instituto Adolfo Lutz. A caracterização filogenéticas das mesmas foi feita no Instituto da Criança pela Dra Silvia Bando, através da técnica de Triplex PCR para os genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2. As condições de reação e controles para as reações de TriplexPCR (filogenia) bem como as sequências dos primers, tamanho do fragmento e ciclos de amplificação, estão descritos em detalhe na tabela 1 e no item 3.4.3.

A presença dos marcadores genéticos de virulência foi verificada através da técnica de PCR para os seguintes genes: *fimA* e *fimH* referentes a fimbria do tipo 1, *papA*, referente a fimbria P, *sfa* referente a fimbria S, *hly* referente a Hemolisina- α e o segmento genético referente a proteína Pic. As condições de reação e controles para as reações de PCR (marcadores de virulência), bem como as sequências dos primers, tamanho do fragmento e ciclos de amplificação, estão descritos em detalhe na tabela 1 e no item 3.4.3.

A capacidade das amostras de liberar hemolisina- α foi determinada através da visualização de hemólise em placas de ágar sangue e a capacidade das amostras de aderir a células epiteliais de origem

humana (linhagem celular Vero) e a formação de biofilme em PVC e poliestireno foram determinadas como descrito nos itens 3.4.5 e 3.4.6.

A determinação da presença de marcadores de virulência, expressão de hemolisina, capacidade de adesão à células Vero e formação de biofilme em PVC e poliestireno foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan pelo aluno.

Figura 3 – Esquema para escolha e caracterização das amostras de *E. coli*

Fonte: (SILVA JR, 2012).

Os resultados da caracterização das amostras foram relacionados com o quadro clínico dos pacientes.

3.4.1 Quadro clínico dos 90 pacientes cujas amostras de urina positivas para *E. coli* foram utilizadas para caracterização

Os quadros clínicos dos pacientes com ITU foram classificados como: cistite, cistite recorrente (CR), cistite com má formação (CMF), cistite recorrente com má formação (CRMF) e pielonefrite (P). O

quadro clínico foi obtido do prontuário médico mediante consentimento por escrito do responsável legal do paciente. O consentimento foi adquirido por meio de formulário de livre esclarecimento (anexo).

3.4.2 Sorotipagem

A sorotipagem consiste na determinação dos antígenos somáticos (O) e dos antígenos flagelares (H).

A determinação dos sorotipos foi realizada através de testes de aglutinação em tubo, segundo metodologia padrão descrita por Ewing *et al.* (1986), utilizando-se anti-soros polivantes O (O1 - O181) e H (H1 - H56).

As cepas submetidas à sorotipagem foram cultivadas em TSB e a seguir isoladas em placas de Agar Triptona de Soja (TSA) e incubadas por 18-24 horas a 37°C para verificar a pureza das amostras.

Após verificar a pureza das amostras, uma colônia isolada em ágar TSA é repicada para tubo de caldo TSB e meio IAL (Pessoa e Silva) para identificação do sorotipo e confirmação da espécie.

As culturas em TSB foram inativadas em banho-maria fervente por 1 hora e a seguir utilizadas para o teste da rugosidade, observando se a cultura não apresentou auto-aglutinação em suspensões com salina mertiolatada.

Para a identificação sorológica foram utilizadas somente cepas lisas.

3.4.2.1 Caracterização dos antígenos somáticos (O)

Para caracterização do antígeno somático foi utilizada uma suspensão bacteriana inativada e diluída de acordo com a escala três de Mac Farland.

Esta suspensão foi submetida a testes de aglutinação em tubo contra os 17 anti-soros polivantes somáticos diluídos a 1/50. A diluição final do antígeno com os anti-soros é de 1/500.

A leitura da reação foi realizada após 18-24h de incubação em Banho Maria (BM) a 48 – 50°C.

Após obtenção deste resultado, os antígenos foram testados com anti-soros monovalentes somáticos, componentes do anti-soro polivalente que apresentou reação de aglutinação. Do mesmo modo, as misturas são incubadas em BM a 48 – 50°C.

Determinado o antígeno somático, a confirmação foi realizada através da titulação, utilizando o anti-soro “O” correspondente. Diluições seriadas do anti-soro somático são utilizadas nos testes de

titulação em tubo para a determinação do título do anti-soro com a cepa em identificação. Considera-se a cepa como pertencente a um sorogrupo quando o título do anti-soro corresponde ao título obtido com a cepa de referência internacional.

O resultado é apresentado em +, ++, ou +++ cruces para os positivos; como (-), negativo, quando não apresenta nenhuma reação de aglutinação. Neste caso são consideradas NT (não tipáveis).

3.4.2.2 Caracterização dos antígenos flagelares (H)

Culturas correspondentes às colônias lisas foram inoculadas em tubos em U contendo ágar semi-sólido (0,2% de ágar) para ativação do antígeno flagelar. Os tubos foram incubados em estufa a 30° C.

Quando a cultura atingiu a outra extremidade do tubo em U, o inóculo desta extremidade foi transferido para outro tubo em U com ágar semi-sólido, conforme descrito acima.

Foram realizadas passagens sucessivas (no mínimo 3-5 passagens), até a cultura atingir a extremidade oposta em 24 horas (ou até 48 horas). Tendo isto ocorrido, as cepas foram repicadas em tubos 16 x 160 mm contendo TSB e incubados por 18-24 horas a 30°C.

As culturas foram inativadas adicionando-se formol (formalina) para dar uma concentração final de 0,5% e mantidas por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente.

Decorrido este período, a suspensão bacteriana inativada foi diluída em aproximadamente 5 mL de salina formulada 0,5% de modo a corresponder a aproximadamente ao tubo 3 da escala de MacFarland.

As suspensões foram submetidas a testes de aglutinação em tubo contra 6 anti-soros polivalentes flagelares.

Os tubos foram incubados por 2 horas em banho-maria a 48-50°C.

A leitura é realizada adotando-se o mesmo critério para a leitura da aglutinação somática: +++++, aglutinação completa; +++, aglutinação forte; ++, aglutinação fraca; -, ausência de aglutinação.

Após obtenção do resultado as amostras foram submetidas a testes com anti-soros monovalentes componentes do polivalente que apresentou reação positiva.

3.4.3 Preparo dos lisados e condições das reações de PCR (Polimerase Chain Reaction)

As técnicas de Triplex PCR e PCR foram realizadas a partir de lisados bacterianos e as condições utilizadas para cada reação de amplificação estão descritas na tabela 1. Os lisados foram preparados da

seguinte forma: uma alíquota de 10 µL de cada amostra bacteriana de *E. coli* foi incubada em 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) por 18h a 37°C e em seguida semeada por estriamento em Mac Conkey ágar por mais 18 h a 37°C para a obtenção de uma colônia pura, que foi subsequentemente semeada por estriamento em LB ágar (LBA) por mais 18 h a 37°C. Após incubação, uma colônia bacteriana de cada amostra foi re-suspendida em 100 µl de água miliQ estéril e em seguida submetida a uma temperatura de 100 °C durante 10 min. Após a amplificação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1,2%, com marcador de peso molecular de 1Kb de DNA com voltagem constante de 70 volts, esses géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,01%.

3.4.4 Verificação da produção de Hemolisina-α

A verificação da produção de Hemolisina-α pelas amostras de *E. coli* foi realizada em placas de ágar sangue que foram preparadas usando como meio base Tryptose Soy ágar (TSA) re-suspendido em uma solução de CaCl₂ (10 mM), pH 7,2. Para o preparado das placas, o meio foi autoclavado e quando a temperatura do mesmo diminuiu para cerca de 42 °C, foram adicionadas hemácias previamente lavadas três vezes em tampão salina fosfato (“phosphate buffered saline” – PBS) pH 7,2 até a concentração final de 5% (método adaptado de BEUTIN, 1991). Para o teste, os noventa isolados de *E. coli* foram cultivados por 18 h a 37 °C em meio Tryptose Soy Broth (TSB). Após a incubação 3 µL da cultura bacteriana foi semeada em placa de ágar sangue e incubada a 37 °C. Como controle positivo foi utilizado a amostra U441. Os resultados dos testes de hemólise foram determinados visualmente pela observação da formação de halos de hemólise ao redor da colônia bacteriana após 3h de incubação.

3.4.5 Teste de adesão celular

3.4.5.1. Linhagem celular. –

Para os testes de adesão foram utilizadas células epiteliais Vero (linhagem derivada de células epiteliais do rim de macaco verde) provenientes do banco de células do Instituto Adolfo Lutz. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 mm em meio DMEM (sem antibiótico) com 10% de soro fetal bovino.

3.4.5.2 Teste de adesão em linhagem celular Vero.

Os testes de adesão foram realizados de acordo com Scaletsky e cols. (1984). Células Vero foram transferidas na concentração de 5×10^4 células/ml para a placa de cultura de células de 24 poços (TPP- Techno Plast Products) forradas com lamínulas esterilizadas. A placa foi mantida a 37 °C em estufa de CO₂ a 5 % por 48 horas, até a formação de uma monocamada com aproximadamente 70 % de confluência.

Após lavagem com PBS 1X estéril, 1ml de meio DEMEM sem antibiótico (Cultilab) contendo 2% de SFB (soro fetal bovino inativado) foi adicionado em duplicata por poço. Subsequentemente, 40 µl de cultura bacteriana previamente crescida em LB por 18 horas a 37 °C foram adicionados por poço. As placas foram então incubadas por 2 ou 3 horas a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%. Após incubação, as células foram lavadas 6 vezes com PBS estéril. Todavia, no caso das placas incubadas por 3 horas, após 2 horas de incubação as placas foram lavadas e 1 ml/poço de meio foi acrescentado. Após mais uma hora de incubação a placa foi novamente lavada 6 vezes com PBS. Após lavagem, as células foram fixadas com metanol 100% (1ml/poço) por 20 minutos . A coloração foi feita com corante May grünwald (merck) diluído 1:2 em tampão Sorensen (33 mM KH₂PO₄; 55 mM Na₂HPO₄; pH 7,3), por 5 minutos e corante Giemsa (Merck) diluído 1:3 com o mesmo tampão, por 20 minutos. O excesso do corante foi retirado com água corrente e as lamínulas secas em temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas em lâminas para a microscopia para posterior visualização em microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes (objetiva 100 X e ocular 10X). Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas

3.4.6 Adesão a superfícies abióticas (formação de biofilme: método indireto)

Este método é uma adaptação de 2 outros trabalhos (ROCHA et al.,2007; CULLER, 2010) comparando 2 tipos de material, PVC (*Polyvinyl chloride* - Policloreto de vinila) e poliestireno. O teste foi realizado em placas de poliestireno ou PVC de 96 poços. Foram utilizados os seguintes controles bacterianos: DH5α (não aderente), J96, 042 e U441.

Para o teste 190 µl de um pool de urina humana foram adicionados aos poços das placas de 96 wells. Subsequentemente, 10 µl de cultura bacteriana previamente crescida em caldo LB em condições estáticas em atmosfera de CO₂ foram adicionados a cada poço. Após 24 h de incubação, foram feitas 4

lavagens com PBS. Após as lavagens, as bactérias aderidas a placa foram fixadas com 200 µL de etanol a 75% por 10 minutos.

Em seguida foi retirado o fixador e adicionado 200 µL de solução de cristal violeta a 0,5%, durante 5 minutos para corar as bactérias. Após 4 lavagens com PBS, as placas foram secas e 200 µl de etanol 95% foram adicionados a cada poço e incubados por 2 minutos a temperatura ambiente para solubilizar o cristal. Subsequentemente, 150 µl de cada poço foram transferidos para uma placa de microtitulação e as absorbâncias foram determinadas em comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) em leitor de ELISA. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas e as incubações foram realizadas a 37 °C em condições estáticas, utilizando atmosfera de CO₂.

3.5 Análises estatísticas

Para comparar a resistência bacteriana das amostras foram utilizados os testes paramétricos Anova com 1 critério, t de Student e os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (com comparações pelo método de Dunn) e Mann-Whitney. O teste Qui-quadrado de tendência foi utilizado para verificar a distribuição da ITU nas faixas etárias. A correlação de Odds Ratio foi utilizada para determinar a relação entre o sexo dos pacientes e os agentes etiológicos. A normalidade de todas as amostras foi verificada pelo teste de Liliefors.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Bioestat (versão 5.00), assumindo $p < 0,05$ como critério de significância. As análises foram realizadas de acordo com Zar (1999). Na ausência de distribuição normal dos dados ou ocorrência de variâncias desiguais foram utilizados testes não-paramétricos.

Tabela 1 – PCR e Triplex PCR - marcadores de virulência, sequência dos primers, tamanho dos fragmentos amplificados e condições das reações.

Genes	Sequência dos primers	Concentração dos primers (pmol)	Ciclo de amplificação	Controles	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>chuA</i>	F 5' GACGAACCAACGGTCAGGAT 3' R 5' TGCCGCCAGTACCAAAGACA 3'	20	94 °C 4 min, 30 x (94 °C 35 seg, 59 °C 10 seg e 72 °C 5 min) e 72 °C 7 min	E2348/69	279	Clermont et al., 2000
<i>yjaA</i>	F 5' TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG 3' R 5' ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC 3'	20	94 °C 4 min, 30 x (94 °C 35 seg, 59 °C 10 seg e 72 °C 5 min) e 72 °C 7 min	E2348/69	211	Clermont et al., 2000
TSPE4.C2	F 5' GAGTAATGTCTGGGGCATTCA 3' R 5' CGCGCCAACAAAGTATTACG 3'	20	94 °C 4 min, 30 x (94 °C 35 seg, 59 °C 10 seg e 72 °C 5 min) e 72 °C 7 min	E2348/69	172	Clermont et al., 2000
<i>Pic</i>	F 5' GGGTATTGTCCGTTCCGAT 3' R 5' ACAACGATACCGTCTCCCG 3'	40	94 °C 5 min, 30 x (94 °C 30 seg, 55 °C 1 min e 72 °C 1 min 30 seg) e 72 °C 7 min	042(+), C600(-)	1175	Henderson et al., 1999
<i>Hly</i>	F 5' GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG 3' R 5' TCTCGCCTGATAGTGTGGTA 3'	40	94 °C 5 min, 30 x (94 °C 1 min, 57 °C 1 min e 72 °C 1 min) e 72 °C 8 min	J96(+), C600(-)	596	M10133.1 (hlyA)
<i>fimA</i>	F 5' CTGTCGGCTCTGTCCCTCAGT 3' R 5'GATGCGGTACGAACCTGTCCTAA 3'	40	95 °C 5 min, 30 x (94 °C 1 min, 65 °C 1 min e 72 °C 1 min) e 72 °C 7 min	J96(+), UEL13(-)	161	Nowrouzian et al., 2003
<i>fimH</i>	F 5' GACGTCACCTGCCCTCCGGTA 3' R 5' TGCAGAACGGATAAGCCGTGG 3'	40	95 °C 5 min, 30 x (94 °C 1 min, 63 °C 30 seg e 72 °C 1 min) e 72 °C 7 min	J96(+), UEL13(-)	508	Hernandes, 2006
<i>Pap</i>	F 5'ATGAAGCGTAATATTATAG 3' R 5' TTATTTCTTATATTCGAC 3'	40	95 °C 5 min, 30 x (94 °C 1 min, 50 °C 1 min e 72 °C 1 min) e 72 °C 7 min	J96(+), UEL13(-)	573	Hernandes, 2006
<i>Sfa</i>	F 5' ATGAGCGTCATAACCTGTTC 3' R 5' CTGTTGGTTTCCAGTTTGAT 3'	40	95 °C 5 min, 30 x (94 °C 1 min, 50 °C 40 seg e 72 °C 1 min) e 72 °C 7 min	RS218(+), DH5a(-)	534	Dudley et al., 2006

F – Forward e R – Reverse

Condições da reação

chuA, *yjaA*, TSPE4.C2 - 2 µl de tampão para PCR (Tris-HCl, pH 8,2 – 20 mM/50 mM KCl); 2 µM de dNTPs; 2,5 U de Taq polimerase, 1µL dos primers, 3µL do lisado
pic - 2,5 µl de tampão para PCR (Tris-HCl, pH 8,2 – 20 mM/50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 200 mM de dNTPs; 0,625 U de Taq polimerase, 1µL dos primers, 1µL do lisado

hly - 5 µl de tampão para PCR (Tris-HCl, pH 8,2 – 20 mM/50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 200 mM de dNTPs; 2,5 U de Taq polimerase, 1µL dos primers, 1µL do lisado
fimA, *fimH*, *pap*, *sfa* - 5 µl de tampão para PCR (Tris-HCl, pH 8,2 – 20 mM/50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 200 mM de dNTPs; 1 U de Taq polimerase, 1µL dos primers, 1µL do lisado

Fonte: (SILVA JR, 2012).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prevalência de infecção urinária em pacientes pediátricos.

Devido ao fato de poucos trabalhos terem sido realizados no Brasil sobre a prevalência de ITU na população infantil, tanto a nível comunitário quanto institucional, verificamos nesse estudo a prevalência de ITU em pacientes pediátricos do sexo masculino e feminino provenientes de um hospital infantil de referência nacional. Para isso 6012 amostras de pacientes pediátricos ambulatoriais ou não, entre 0 a 16 anos de idade foram analisadas pelo período de um ano para determinar a prevalência de ITU nessa população. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que das 6012 amostras de urina analisadas, 16,99% (1021) foram positivas para ITU, sendo 10,23% pacientes do sexo masculino e 6,76% do sexo feminino. A porcentagem de 16,98% de ITU (Tabela 2) encontrada em nosso estudo é muito maior do que a descrita na literatura. Por exemplo, é estimado que nos Estados Unidos 2,4% a 2,8% de crianças anualmente são acometidas por ITU (FREEDMAN, 2005). Esta diferença pode ser devida ao trabalho de Freedman (2005), ter sido realizado com um conjunto de clínicas, centros médicos e hospitais públicos e privados, de atendimento pediátrico, abrangendo algumas comunidades pelo país. Todavia, um estudo realizado no Hospital Ana Costa, localizado em Santos, SP, onde foram analisadas 6322 amostras de pacientes pediátricos entre 0 a 12 anos, mostrou que 12% das crianças analisadas apresentaram ITU. No entanto, levando-se em consideração apenas os pacientes positivos para ITU (1021), observamos que, 60,24% dos pacientes com ITU pertencem ao sexo masculino e 39,76% ao feminino (Tabela 2). O contrário foi observado no Hospital Ana Rosa onde 72% das amostras positivas foram obtidas de pacientes do sexo feminino e apenas 28% do masculino (LOURENÇO et al., 2005). Estudos semelhantes em outros países como Índia (64%), México (68,9%), Iran (65,2% - 85,2%), Canadá (56,3%), Itália (53%) e um estudo multicentrico envolvendo vários países (Iran, Vietnã, Austrália, Eslováquia e Suécia -65%) mostraram que a maior parte dos pacientes com ITU é do sexo feminino (EMAMGHORASHI et al., 2011; JADHAV et al., 2011; KASHEF et al., 2010; KWAN; ONYETT, 2008; MOLINA-LÓPEZ et al., 2011; RAMOS et al., 2011). Todavia, resultados obtidos em um estudo na Índia mostraram que a maior parte dos pacientes com ITU nas faixas etárias de 1 a 5 e de 5 a 12 anos era do sexo masculino (Tabela 4). Em nosso trabalho a maioria dos pacientes do sexo masculino positivos para ITU foi encontrada em faixas etárias abaixo de 10 anos (gráfico 1).

A divergência encontrada entre os estudos mostrados indica que a prevalência de ITU em crianças varia de acordo com a população, raça, hábitos de higiene e sexo do paciente (CHANG; SHORTLIFFE, 2006).

Tabela 2 – Número de pacientes com ITU do sexo feminino e masculino

Nº pacientes femininos		Nº pacientes masculinos		Nº total de pacientes com ITU		Nº pacientes masculinos com ITU		Nº pacientes femininos com ITU		Nº pacientes femininos com ITU entre as amostras positivas		Nº pacientes masculinos com ITU entre as amostras positivas	
Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
3868/6012	61,3	2326/6012	38,7	1021/6012	16,98	615/6012	10,23	406/6012	6,73	406/1021	38,68	615/1021	61,3

Fonte: (SILVA–JUNIOR, 2012)

Uma análise mais detalhada dos resultados mostrou que a prevalência de infecção urinária em ambos os sexos variou de acordo com a faixa etária dos pacientes. Observamos que entre 0 e 8 anos de idade a prevalência de casos é maior nos pacientes do sexo masculino do que no feminino, sendo respectivamente 9,08% e 1,25%. No entanto, na faixa etária de 8 a 16 anos ocorreu o contrário, o sexo masculino mostrou uma prevalência de 1,14% e o feminino de 5,58%. Provavelmente essa mudança esteja relacionada com a entrada na puberdade, onde fatores hormonais e hábitos sociais podem exercer influência no número de casos de ITU no sexo feminino. Comparando a prevalência de ITU em faixas etárias de períodos menores (2 anos por faixa etária), observamos que nos meninos o número de casos diminui com a idade do paciente, enquanto o contrário ocorre no sexo feminino, cuja tendência foi aumentar com a idade do paciente, embora, uma diminuição na prevalência de ITU nas faixas etárias de 2 a 4 e 4 a 6 anos tenha sido observada em meninas (gráfico 1, tabela 3). Talvez essa diminuição de casos nessas faixas etárias possa estar associada ao fato de que entre 2 a 4 anos de idade as crianças passam a não usar mais fraldas.

Gráfico 1 – Prevalência de ITU de acordo com a idade dos pacientes (n =6012).

Fonte: (SILVA- JUNIOR, 2012).

Tabela 3 – Prevalência de ITU por sexo e faixa etária (n = 6012).

Sexo	Faixas etárias n(%)								Qui-quadrado de tendências
Meninos	0 até 2 291(4,84)	2 até 4 140(2,33)	4 até 6 54(0,90)	6 até 8 61(1,01)	8 até 10 55(0,91)	10 até 12 11(0,18)	12 até 14 1(0,02)	14 até 16 2(0,03)	A= -898,4884 p < 0,0001
Meninas	0 até 2 38(0,63)	2 até 4 13(0,22)	4 até 6 5(0,08)	6 até 8 20(0,33)	8 até 10 58(0,96)	10 até 12 84(1,40)	12 até 14 91(1,51)	14 até 16 97(1,61)	A= 747,5073 p< 0,0001

Fonte: (SILVA- JUNIOR, 2012).

Os resultados da análise de tendências obtidos em nosso trabalho confirmam dados descritos na literatura que indicam que a incidência de ITU em meninos é maior durante os primeiros anos da vida (CAMPOS et al., 2006; FALCÃO et al., 2000; HEILBERG; SCHOR, 2003). Todavia, os trabalhos publicados sobre ITU em pacientes adultos ou pediátricos variam entre si, quanto à população, sexo, faixas etárias estudadas e tipo de análise estatística utilizada, o que pode levar a uma divergência de resultados. A Tabela 4 mostra alguns resultados obtidos na literatura científica em estudos realizados sobre a prevalência de ITU em populações de diferentes faixas etárias.

Tabela 4 – Prevalência de ITU por sexo e faixa etária em diferentes países

Sexo	Faixa etária	Prevalência(%)	Origem	N	Referência
Não discriminado	0 – 4 semanas	2,94	Iran, Hospitalar	912	MASHOUF et al., 2009
	5 semanas – 2 anos	5,13			
	2 – 12 anos	9,17			
	13 – 18 anos	16,96			
Meninos	1 – 5 anos	5,88	Índia, Hospitalar	1974	TANEJA et al., 2010
	5 – 12 anos	8,26			
Meninas	1 – 5 anos	1,37			
	5 – 12 anos	1,82			
Não discriminado	18 – 65 anos	11,7	Turquia, multi- centros	20119	ARSLAN et al., 2005
Meninos	Recém-nascidos	2,15	São Paulo, Hospitalar	1196	FALCÃO et al., 2000
Meninas		2,93			
Homens	Adultos	2,8	Turquia Hospitalar	38703	YILMAZ et al., 2009
Mulheres		11,72			
Homens	Adultos e crianças	3,43	República da África Central, Hospitalar	5128	BERCION et al., 2009
Mulheres		5,21			

Fonte: (SILVA- JUNIOR, 2012).

4.2 Identificação e prevalência dos agentes etiológicos encontrados na urina dos pacientes pediátricos com quadro clínico de ITU.

Das 1021 amostras de urinas positivas para ITU, as bactérias Gram-negativas foram responsáveis pelo maior número de casos de infecção urinária (907 pacientes – 88,83%) (Figura 3). Os principais agentes etiológicos Gram-negativos presente nas amostras foram os seguintes: *E. coli* (51,27%), *Proteus* spp. (19,07%), *Pseudomonas* spp. (11,69%), *Enterobacter* spp. (8,93%) e *Klebsiella* spp. (7,83%) (Gráfico 3). Apenas 49 amostras de urina (4,8%) foram positivas para bactérias Gram-positivas (Gráfico 2), sendo que o principal agente etiológico pertencentes a esse grupo foi: *S. aureus* (51,02%), (Gráfico 4). Por outro lado *Candida* spp. (Figura 3) foi encontrada apenas em 65 amostras de urina (6,37). Dados semelhantes aos nossos para *E. coli* foram encontrados por Hörner et al. (2006) em um estudo realizado no Hospital Universitário de Santa Maria, RS, onde a análise de 2629 amostras de pacientes ambulatoriais e hospitalizados mostrou que *E. coli* foi responsável por 52,1% dos casos positivos. Todavia, no mesmo estudo foi observado uma porcentagem muito menor de *Proteus* spp. (2,71%) que a encontrada em nosso estudo, onde *Proteus* spp. foi o segundo agente etiológico mais isolado entre todas as amostras analisadas, representando 19,07% das amostras Gram-negativas.

Tendo em mente que a prevalência do agente etiológico responsável por ITU varia de acordo com a idade do paciente, a diferença de resultados para *Proteus* spp. encontrada entre os dois estudos pode estar relacionada com o fato da população analisada no hospital Santa Maria ser mais heterogênea, desde que em vista que no estudo desse hospital foram considerados pacientes adultos e pediátricos. Em acréscimo, tanto a prevalência de ITU quanto a do patógeno podem variar de acordo com a faixa etária do paciente. Esse fato é bem ilustrado no trabalho realizado por Quereshi (2005) no Hospital de Ensino Ayub, Abbottabad no Paquistão, onde amostras de urina de 100 pacientes entre 0 a 15 anos de idade com quadro clínico de ITU foram analisadas. Nesse trabalho foi demonstrado que a quantidade de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. variou de acordo com a idade dos pacientes. Em nosso trabalho também observamos que a prevalência de *E. coli* e *Proteus* spp. em ambos os sexos mudou de acordo com a faixa etária do paciente (Gráfico 6). Todavia, entre a faixa etária de 6 a 8 anos a quantidade de *E. coli* é praticamente a mesma para ambos os sexos enquanto *Proteus* spp. nessa mesma faixa etária é encontrado apenas no sexo masculino. Além disso, observamos através da correlação feita pelo teste de Odds Ratio que a prevalência de alguns uropatógenos foi diferente entre pacientes do sexo feminino e masculino. Essa análise estatística mostrou que a probabilidade de um paciente do sexo feminino com ITU estar infectado por *E. coli* ou *Staphylococcus* spp. (coagulase negativa)

é respectivamente 3,03 e 6,95 vezes maior que um paciente do sexo masculino, $p < 0,05$ (Tabela 5). Todavia, a probabilidade de um paciente do sexo masculino estar infectado por *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. foi respectivamente 2,72 e 4,15 vezes maior que a de um paciente do sexo feminino, com $p < 0,05$. Por outro lado, *Enterococcus* spp. e *S. malthophilia* só foram encontrados em pacientes do sexo masculino (Gráfico 5), enquanto *E. coli* foi o agente etiológico predominante em ambos os sexos e em todas as faixas etárias.

Gráfico 2 – Prevalência de uropatógenos identificados pelo método de Gram, isolados da urina de pacientes pediátricos (n= 1021).

Fonte: Fonte: (SILVA- JUNIOR, 2012)..

Gráfico 3 – Espécies de bactérias Gram-negativas encontradas nas amostras de urina de pacientes pediátricos (N = 907).

Fonte: (SILVA- JUNIOR, 2012)..

Gráfico 4 – Espécies de bactérias Gram-positivas encontradas nas amostras de urina de pacientes pediátricos (n = 49).

Fonte: (SILVA- JUNIOR, 2012).

Gráfico 5 – Agentes etiológicos encontrados nas amostras de urina de pacientes pediátricos

(N = 1021, 615 sexo masculino e 406 sexo feminino). 1 – *E. coli*, 2 – *Proteus*, 3 – *Pseudomonas*, 4 – *Enterobacter*, 5 – *Klebsiella*, 6 – *Candida*, 7 – *Staphylococcus aureus*, 8 – *Staphylococcus spp.*, 9 – *Enterococcus spp.*, 10 – *Serratia spp.* 11 - *Stenotrophomonas maltophilia*. * diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p < 0,05$. Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Tabela 5 – Odds Ratio da relação dos agentes etiológicos com o sexo dos pacientes.

Agentes etiológicos da Infecção do Trato Urinário					
SEXO					
Masculino		Feminino		Odds Ratio	IC 95%
<i>E. coli</i>	Outros	<i>E. coli</i>	Outros		
214	401	251	155	3,0344 ^{F-M}	2,3396 – 3,9356 *
<i>Proteus spp.</i>	Outros	<i>Proteus spp.</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
135	480	38	368	2,7237 ^{M-F}	1,8539 – 4,0016 *
<i>Pseudomonas spp.</i>	Outros	<i>Pseudomonas spp.</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
67	548	39	367	1,1505 ^{M-F}	0,7587 – 1,7446
<i>Enterobacter spp.</i>	Outros	<i>Enterobacter spp.</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
69	546	12	394	4,1493 ^{M-F}	2,2175 – 7,7641 *
<i>Klebsiella spp.</i>	Outros	<i>Klebsiella spp.</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
47	568	24	382	1,317 ^{M-F}	0,792 – 2,1901
<i>Candida spp.</i>	Outros	<i>Candida spp.</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
49	566	16	390	2,1162 ^{M-F}	1,1828 – 3,2648 *
<i>S. aureus</i>	Outros	<i>S. aureus</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
10	605	15	391	2,321 ^{M-F}	0,263 – 25,5946
SCN	Outros	SCN	Outros	Odds Ratio	IC 95%
2	613	9	397	6,9484 ^{F-M}	1,4935 – 32,327 *
<i>Serratia spp.</i>	Outros	<i>Serratia spp.</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
4	611	2	404	1,3191 ^{M-F}	0,2405 – 7,2359
<i>S. malthophilia</i>	Outros	<i>S. malthophilia</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
5	610	0	406	-----	-----
<i>Enterococcus spp.</i>	Outros	<i>Enterococcus spp.</i>	Outros	Odds Ratio	IC 95%
13	602	0	406	-----	-----

^{M-F} Sexo Masculino por feminino

^{F-M} Sexo Feminino por masculino

* Diferença estatisticamente significativa p<0,05

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Gráfico 6 – Número de casos de infecção do trato urinário (ITU) em pacientes pediátricos. Os agentes etiológicos (*E. coli* e *Proteus* spp.) foram identificados em 638 amostras

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

4.3 Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas da urina de pacientes pediátricos

O perfil antimicrobiano das bactérias Gram-negativas isoladas da urina dos pacientes pediátricos com ITU foi determinado em 907 isolados bacterianos. Os resultados mostraram que 81,15% de todos os isolados bacterianos foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano e 59,87% foram resistentes a duas ou mais classes de agentes antimicrobianos. Apenas 18,85% de todos os isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Perfil de resistência e sensibilidade a agentes antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas da urina de 907 pacientes pediátricos

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Gráfico 8 – Perfil de resistência a agentes antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de urina de pacientes (N = 907).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Os perfis de resistência a agentes antimicrobianos entre as diferentes espécies de bactérias Gram-negativas foram comparados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn utilizado para comparações múltiplas entre grupos ($H = 211,6741$, $p < 0,001$). A análise dos resultados mostrou que *E. coli* foi a bactéria que demonstrou maior sensibilidade aos agentes

antimicrobianos ($p < 0,05$), seguida por *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. cujos resultados não diferiram entre si. *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. foram os agentes etiológicos que mostraram maior resistência aos antimicrobianos testados. *Serratia* spp. (6 isolados) e *S. malthophilia* (5 isolados) apresentaram um perfil multi-resistente a agentes antimicrobianos, todavia, não foram incluídos no teste estatístico, devido ao baixo número de isolados encontrados (Gráfico 8, Tabela 6).

Observamos na tabela 6 que as bactérias Gram-negativas mostraram maior resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina 63,17% (573/907), nitrofurantoína 36,93% (335/907), sulfametaxol/trimetopim 27,9% (253/907), gentamicina 15,56% (141/907) e amicacina 12,56% (114/907). Todavia os antibióticos que essas bactérias mostraram maior sensibilidade foram: cefalexina 99,56% (903/907), cloranfenicol 98,46% (893/907), meropenem 96,36% (874/907), levofloxacina 94,81% (860/907) e ceftriaxona 94,71% (859/907). Resultados semelhantes para penicilina foram obtidos em estudos realizados na Grécia, Canadá, Índia, Paraná, México, Rio de Janeiro, Iran, Vietnã, Austrália, Eslováquia, Suécia, Itália, São Paulo, onde esse foi o antibiótico cujos patógenos demonstraram maior resistência (ANATOLIOTAKI et al., 2007; CARACCIOLO et al., 2011; DIAS et al., 2009; EMAMGHORASHI et al., 2011; GUIDONI et al., 2008; GÜNDOĞDU et al., 2011; JADHAV et al., 2011; MOLINA-LÓPEZ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; RAMOS et al., 2011; UPTON et al., 1999). Todavia, foi também observado em alguns desses estudos uma baixa resistência a nitrofurantoína como na Grécia (2,2%), Canadá (2,7%), Iran (3,2%), São Paulo (6%), Rio de Janeiro (3%), México (5,5%) e Itália (<1%) valores esses muito menores que o encontrado em nosso estudo. Já em outros países como o Iran (28,7%) e a Índia (42,7%) a resistência a nitrofurantoína foi muito maior assim como foi a encontrada em nosso trabalho (JADHAV et al., 2011; KASHEF et al., 2011;). Vale a pena salientar que nossos resultados mostraram que 91% das amostras de *Proteus* spp. eram resistentes a nitrofurantoína. Esse dado é muito importante levando-se em consideração que *Proteus* spp. é a espécie bacteriana que mais afeta crianças do sexo masculino entre 0 a 2 anos de idade nos casos de ITU.

Quanto à resistência bacteriana a classe das sulfonamidas, resultados semelhantes ao mostrado no presente estudo (27,9 %) foram encontrados na Grécia (22 %) e no Canadá (27 %). Uma resistência ainda mais alta ao sulfametaxol/trimetopim (antibiótico da classe das sulfonamidas) foi encontrada em pacientes pediátricos com ITU em estudos realizados em Goiânia, Brasília e Rio de Janeiro cujos resultados mostraram uma resistência de uropatógenos a esse antibiótico de 41%, 49,4% e 65,6% para cada estado (EPARIS et al., 2006; PIRES et al., 2007; POLLETO; REIS 2005;). Esses resultados indicam

que os uropatógenos, independente da população analisada, tendem a possuir uma resistência considerável a agentes antimicrobianos da classe das sulfonamidas.

Além da variação geográfica e populacional, a resistência dos uropatógenos a agentes antimicrobianos também pode variar de acordo com a idade dos pacientes. Observamos pelo teste de Kruskal-Wallis, com o método de Dunn, que houve um aumento significativo da resistência de uropatógenos a agentes antimicrobianos em pacientes do sexo feminino entre as faixas etárias de 0 a 2 anos e 14 a 16 anos ($H = 15.2033$, $p < 0.05$). Essa diferença é importante uma vez que pacientes do sexo feminino representam a maioria dos casos de ITU na idade adulta. Em acréscimo, ao compararmos nossos resultados com dados publicados na literatura em pacientes adultos, observamos um aumento de resistência a fluoroquinolonas na fase adulta. Por exemplo, verificamos que a resistência de *E. coli* a fluoroquinolonas (4,5%) encontrada em nosso estudo foi muito menor que a encontrada na América Latina em pacientes adultos cujos resultados obtidos para esses antibióticos foram de 17,5% a 18,9% para fluoroquinolonas e (GALESAA et al., 2002). Todavia a resistência de *Klebsiella* spp. às fluoroquinolonas encontrada em adultos no mesmo estudo (14% a 28%) foi semelhante a encontrada por nós cujo valor variou entre 11% a 28%. Um aumento da resistência de *E. coli* a fluoroquinolonas também foi observado na Europa (ENA et al, 1995) em pacientes com infecção urinária. Além disso, um estudo realizado na Espanha também mostrou que fezes de crianças e adultos saudáveis, bem como animais domésticos saudáveis são portadoras de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas (BLANCO et al. 1997; GARAU et al, 1999). Esses estudos indicam que a microbiota presente no intestino humano saudável é um reservatório natural de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas, adquiridas através de alimentos ou indiretamente entre um grupo de pessoas. O aumento da resistência de uropatógenos a essa classe de antibióticos também pode estar relacionado a transferência horizontal de genes de virulência por plasmídios, como demonstrado *in vitro* por Martínez-Martínez et al. (1998) onde um plasmídio com genes de resistência a fluoroquinolonas foram transferidos de *Klebsiella pneumoniae* para *E. coli*.

Tabela 6 – Perfil de resistência a agentes antimicrobianos de bactérias Gram negativas isoladas da urina de pacientes pediátricos.

	Classes de antibióticos																	
	Aminoglicosídeos		C1 ^a G CFE	C2 ^a G CT	B – Lactâmicos			P AP	PIB PPT	Carbapenêmicos		DI NT	Fluoroquinolonas			M ATM	A CLO	ST SFT
	AM	GN			CAZ	C3 ^a G CTX	CRO			IPM	MPM		CIP	LEV	NOR			
<i>Escherichia coli</i>	21/465	37/465	4/465	28/465	1/465	20/465	4/465	258/465	25/465	8/465	0/465	65/465	21/465	8/465	16/465	4/465	0/465	149/465
<i>Proteus spp.</i>	8/173	10/173	0/173	19/173	12/173	18/173	12/173	108/173	13/173	0/173	0/173	128/173	15/173	4/173	16/173	8/173	0/173	23/173
<i>Pseudomonas spp.</i>	40/106	32/106	0/106	21/106	40/106	28/106	13/106	68/106	40/106	32/106	24/106	61/106	38/106	8/106	33/106	20/106	8/106	36/106
<i>Enterobacter spp.</i>	24/81	36/81	0/81	24/81	22/81	32/81	11/81	68/81	16/81	4/81	4/81	52/81	12/81	4/81	13/81	12/81	4/81	28/81
<i>Klebsiella spp.</i>	17/71	21/71	0/71	0/71	8/71	4/71	8/71	60/71	4/71	8/71	2/71	26/71	11/71	20/71	8/71	9/71	0/71	15/71
<i>Serratia spp.</i>	2/6	3/6	0/6	0/6	2/6	0/6	0/6	6/6	2/6	6/6	6/6	1/6	2/6	2/6	0/6	2/6	1/6	1/6
<i>S. maltophilia</i>	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	1/5	2/5	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	1/5
GERAL	114/907	141/907	4/907	92/907	85/907	102/907	48/907	573/907	100/907	54/907	33/907	335/907	99/907	47/907	86/907	55/907	14/907	253/907

Nº de cepas resistentes/Nº total de cepas

Aminoglicosídeos (AM – Amicacina, GN – gentamicina);

β-Lactâmicos

C1^aG – Cefalosporinas 1^a geração (CFE – cefalexina),

C2^aG – Cefalosporinas de 2^a geração (CT – cefoxitina),

C3^aG – Cefalosporinas de 3^a geração (CAZ – Ceftazidima, CTX – cefotaxima, CRO – ceftriaxona),

P – Penicilinas (AP – Ampicilina),

PIB – Penicilinas+Inibidor de β-Lactamase (PPT – piperacilina/tazobactam);

Carbapenêmicos (IPM – imipenem, MPM – meropenem);

DI – Derivados imidazólicos (NT – nitrofurantoína);

Fluoroquinolonas (CIP – Ciprofloxacina, LEV – levofloxacina, NOR – norfloxacina);

M – Monobactâmicos (ATM – aztreonam);

A – Anfenicóis (CLO – cloranfenicol);

ST – Sulfonamidas e Trimetopim (SFT – sulfometaxol/trimetopim).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

4.4 Caracterização dos 90 isolados de *Escherichia coli*

Embora as bactérias anaeróbias no intestino superem o número de *E. coli* (100/1 a 10.000/1) (TENAILLON et al., 2010), *E. coli* é o organismo aeróbio predominante no trato gastrointestinal, estando entre as primeiras espécies bacterianas que colonizam o intestino durante a infância, antes da expansão dos anaeróbios. Estima-se que dois anos após o nascimento, a densidade de *E. coli* no intestino é estabilizada e se mantenha por volta de 10^9 unidades formadoras de colônia por grama de fezes até diminuir com o envelhecimento do hospedeiro. A grande quantidade de *E. coli* presente no intestino e a proximidade do canal da uretra com o anus facilita a transmissão de *E. coli* intestinais ao trato urinário onde essas bactérias podem causar infecção (RUSSO et al., 1995; WILES et al. 2008).

A grande diversidade genética e de mecanismos de virulência encontrados em *E. coli*, cuja origem pode ser intestinal ou extra-intestinal, pode influenciar no desenvolvimento, estabelecimento e nas manifestações clínicas dos diferentes quadros clínicos de ITU causados por essas bactérias (BIDET et al., 2007; EWERS et al., 2007). Essa situação é ainda mais séria em crianças, onde o risco de desenvolver danos crônicos no sistema urinário é alto (KOCH; ZUCCOLOTTO, 2003). Devido à importância desses organismos no desenvolvimento de ITU em pacientes pediátricos, foi determinado nesse trabalho, a filogenia e o potencial de virulência, sorotipo e capacidade de adesão às células epiteliais, PVC e poliestireno de 90 isolados de *E. coli* selecionados aleatoriamente como descrito no item 3.4 de Material e Métodos. Os dados obtidos foram comparados com o quadro clínico dos pacientes.

4.4.1 Quadro clínico dos pacientes com ITU

Verificamos que a maior parte das 90 amostras de *E. coli* isoladas para caracterização foi proveniente de casos de cistite (90%) que foi encontrada tanto em pacientes com o aparelho urinário normal (37,78%), aparelho urinário com má-formação (45,56%) ou com disfunção miccional (6,66%). Entre os pacientes com cistite e aparelho urinário normal, apenas 6,67% apresentaram recorrência enquanto um número maior de recorrência (25,56%) foi encontrado no grupo de pacientes com má-formação. Esses dados estão de acordo com a literatura que mostra que a maior parte dos pacientes pediátricos com ITU apresentam algum tipo de má formação e são mais susceptíveis a

recorrência (KOCH; ZUCCOLOTTO, 2001). Observamos também que apenas dez por cento dos pacientes apresentaram quadro clínico de pielonefrite com algum tipo de má formação ou disfunção miccional, contudo, sem nenhuma recorrência (Gráfico 9). Todavia, estudos realizados na Índia (20,56%) e no Iran (50,8%) mostraram uma porcentagem muito maior de pacientes com pielonefrite, sendo que no Iran, a porcentagem encontrada para pielonefrite foi praticamente à mesma que a encontrada para cistite (EMAMGHORASHI et al., 2011; JADAV et. al., 2011;).

Gráfico 9 – Quadro clínico de 90 pacientes pediátricos de 0 a 16 anos com ITU

E. coli foi o agente etiológico isolado da urina (Cistite aparelho urinário normal – C, Cistite com déficit miccional – CDM, Cistite aparelho urinário normal recorrente – CR, Cistite com má-formação – CMF, e Cistite recorrente com má-formação – CRMF).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

4.4.2 Filogenia de *E. coli*

Para se determinar como *E. coli* se adapta aos diferentes nichos comensais, é necessário revelar como as diversas cepas de *E. coli* se estruturam geneticamente em escala global. Um estudo realizado através do MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis) revelou que apesar da sua enorme diversidade genética, existem apenas poucos genótipos distintos de *E. coli* sendo que, clones idênticos foram isolados de hospedeiros de diferentes regiões geográficas (MILKMAN, 1973; SELANDER; LEVIN, 1980). Baseado no fenograma caracterizado através do MLEE, foram

identificados quatro grupos de *E. coli*: A, B1, B2 e D (CLERMONT et al., 2000). No grupo A predomina a maior parte das *E. coli* comensais, enquanto nos grupos B2 e D se encontram principalmente *E. coli* virulentas de origem extraintestinal. Foi verificado que a prevalência desses grupos filogenéticos em humanos varia de acordo com a população. Por exemplo, um estudo efetuado em populações de regiões geográficas distintas, utilizando a técnica de triplex-PCR (Figura 4) mostrou que na população nativa da Bolívia 77% das *E. coli* pertencem ao grupo A, enquanto na Austrália a prevalência desse grupo foi de apenas 19,5%. Foi também observado que enquanto na Suécia, Estados Unidos, Japão e Austrália a prevalência do grupo B2 é maior que 40%, em Mali e na Guiana Francesa a prevalência desse grupo é respectivamente de 2 e 3 % (TENAILLON et al., 2010). Em nosso estudo verificamos que não houve muita diferença entre o número de pacientes do sexo feminino e masculino em cada grupo filogenético. Todavia, um número maior de pacientes de ambos os sexos foi predominante no grupo B2 (Gráfico 10). Observamos também que a maior parte das amostras de urina analisadas pertence ao grupo filogenético B2 (42,22%), seguido pelo D (25,56%), A (21,11%) e apenas 11,11% dos isolados pertencem ao grupo filogenético B1 (Gráfico 11). Um estudo realizado no Rio de Janeiro também mostrou uma maior prevalência no grupo B2 (52,6 %) e resultados semelhantes ao nosso para o grupo B1 (10,55 %). Todavia uma prevalência menor (10,55 %) que a encontrada por nós foi descrita por eles para o grupo D. No entanto, outro trabalho realizado no Rio de Janeiro mostrou uma prevalência muito maior de isolados no grupo D (36,4 %) (REGUA-MANGIA et al., 2010; DIAS et al., 2009); No México, a maior parte dos isolados de *E. coli* foi encontrada no grupo B2 (35 %), porém, não houve diferença significativa entre a quantidade de amostras encontradas nos grupos filogenéticos A (28,7 %) e D (27,8 %) (MOLINA-LÓPEZ et al., 2011). Trabalhos realizados Na Austrália, Iran, Vietnã, Eslováquia e Suécia mostraram que existe uma grande variação entre a quantidade de amostras encontradas em cada grupo filogenético, mesmo dentro de um mesmo estudo. (GÜNDOĞDU et al, 2011; RAMOS et al., 2011; RAMOS et al. 2011; ABDALLAH et al., 2011). Ao contrário dos resultados observados nesses trabalhos, um estudo realizado com pacientes portadores de desordem neurológica e bexiga neurogênica, mostrou que as *E. coli* uropatogênicas provenientes desses pacientes se distribuíram igualmente entre os quatro grupos filogenéticos (MLADIN et al., 2009). Por outro lado, em animais domésticos onde a transmissão de bactérias patogênicas para humanos pode ocorrer com facilidade, foi observado que a maior parte das *E. coli* uropatogênicas analisadas nesses animais foi encontrada no grupo B2 (65%). Todavia, uma porcentagem menor de *E. coli* (10% por grupo) que a

encontrada em nosso trabalho (21,11 e 25,56%) foi encontrada pelos pesquisadores nos grupos A e D. Provavelmente, isso se deve ao fato de ser B1, o grupo filogenético predominante na microbiota de animais domésticos (TENAILLON et al., 2010).

Figura 4 – Perfil em gel de agarose dos marcadores do tríplex-PCR, estão demonstrados no gel as seguintes amostras: da esquerda para a direita DV 031, DV 028, DV 020, DV 018, DV 016, DV 015, DV 012, DV 003, DV 001, E2348/69 (controle positivo) e peso molecular de 1Kb.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Gráfico 10 – Percentual de pacientes pediátricos com ITU dos sexos masculinos e femininos por grupo filogenético (N = 90, meninas = 48, meninos = 42).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Gráfico 11 – Grupos filogenéticos de 90 amostras *E. coli* provenientes de pacientes pediátricos com ITU.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Quanto a relação dos grupos filogenéticos com o quadro clínico do paciente, observamos que nenhuma amostra classificada como pertencente ao grupo filogenético A foi isolada em casos

de pielonefrite, sendo que, em todos os quadros clínicos, o principal grupo filogenético encontrado foi o B2. As únicas exceções foram as amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com quadro clínico de cistite com má-formação, onde o grupo filogenético predominante foi o D. Em todos os isolados de pacientes com má formação (recorrente ou não) o segundo maior grupo filogenético encontrado foi o A (Tabela 7).

Tabela 7 – Grupo filogenético das amostras de *E. coli* uropatogênicas em relação ao quadro clínico do paciente.

Quadro clínico	Grupo filogenético			
	A	B1	B2	D
Cistite aparelho urinário normal	6/19	1/10	14/38	7/23
Cistite com disfunção miccional	1/19	0/10	4/38	1/23
Cistite com má-formação	5/19	2/10	9/38	2/23
Cistite aparelho urinário normal recorrente	1/19	1/10	3/38	1/23
Cistite recorrente com má-formação	6/19	4/10	4/38	9/23
Pielonefrite	0/19	2/10	4/38	3/23
Total	19	10	38	23

Nº de cepas pertencentes ao grupo filogenético/Nº total de cepas

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

4.4.3 Perfil de virulência

A intensa pressão seletiva que as bactérias comensais sofrem no lúmen intestinal promove a emergência de fatores de virulência e o aumento da resistência a agentes antimicrobianos, o que faz com que bactérias comensais que vivem em simbiose com o hospedeiro se tornem um reservatório de cepas virulentas e resistentes (TENAILLON et al., 2010). Todavia, como observamos nesse estudo, alguns fatores de virulência são essenciais para o desenvolvimento de infecção urinária por *E. coli* como a fimbria do tipo 1, cujos marcadores (*fimA* e *fimH*) estavam presentes em todas as amostras analisadas (Gráfico 12, Figura 5, Figura 6). Resultado semelhante foi obtido em um estudo realizado no Hospital São Paulo, onde 93,8% das amostras de *E. coli* isoladas da urina de pacientes com ITU foram positivas para *fimH* (ABE et al., 2008). O marcador *fimH*, também foi o mais encontrado em trabalhos realizados em pacientes com ITU na Suécia (96 %), Inglaterra (97 %) e China (80 %) (NORINDER et al., 2012, MLADIN et al., 2009, GIBREEL et al., 2011, ABDALLAH et al., 2011). Até mesmo pacientes com disfunção do trato urinário, no caso

bexiga neurogênica, apresentaram uma alta prevalência desse marcador (80 %) (TRAMUTA et al., 2011).

O segundo marcador de virulência mais encontrado em nosso trabalho foi (*pap*) para a fimbria P (53,33%), seguido pelo marcador genético para a fimbria do tipo S (*sfa*) (32,22%), fenótipo de hemólise α (28,89%), marcador genético para Hemolisina- α (*hly*) (21,11%) e marcador genético da toxina Pic (10%) (Gráfico 12, Figura 7, Figura 8, Figura 9, Figura 10, Figura 11). Na Suécia perfis semelhantes aos encontrados no presente trabalho foram descritos para *pap* (43%) e *hly* (28%) (NORINDER et al., 2012). Todavia, um estudo realizado no Paraná mostrou que a porcentagem de *sfa* (26 %) e de *pap* (25 %) foram praticamente às mesmas, contudo, uma porcentagem bem menor de *hly* (5 %) foi encontrada nesse estudo (OLIVEIRA et al., 2011).

Gráfico 12 – Fatores de virulência de 90 amostras de *E. coli* isoladas de pacientes pediátricos.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Figura 5 – Perfil em gel de agarose do *fimA*, estão demonstrados no gel as seguintes amostras: da esquerda para a direita Peso molecular de 1Kb, J96 (controle positivo), UEL13 (controle negativo), DV 001, DV 003, DV 012, DV 015, DV 016, DV 018, DV 020, DV 028, DV 031.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Figura 6 – Perfil em gel de agarose do *fimH*, estão demonstrados no gel as seguintes amostras: da esquerda para a direita Peso molecular de 1Kb, J96 (controle positivo), UEL13 (controle negativo), DV 001, DV 003, DV 012, DV 015, DV 016, DV 018, DV 020, DV 028, DV 031.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Figura 7 – Perfil em gel de agarose do *papA*, estão demonstrados no gel as seguintes amostras: da esquerda para a direita Peso molecular de 1Kb, J96 (controle positivo), UEL13 (controle negativo), DV 001, DV 003, DV 012, DV 015, DV 016, DV 018, DV 020, DV 028, DV 031.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Figura 8 – Perfil em gel de agarose do *sfa*, estão demonstrados no gel as seguintes amostras: da esquerda para a direita Peso molecular de 1Kb, RS218 (controle positivo), DH5 α (controle negativo), DV 001, DV 003, DV 012, DV 015, DV 016, DV 018, DV 020, DV 028, DV 031.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Figura 9 – Perfil em gel de agarose do *pic*, estão demonstrados no gel as seguintes amostras: da esquerda para a direita Peso molecular de 1Kb, 042 (controle positivo), C600 (controle negativo), DV 001, DV 003, DV 012, DV 015, DV 016, DV 018, DV 020, DV 028, DV 031.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Figura 10 – Perfil em gel de agarose do *hly*, estão demonstrados no gel as seguintes amostras: da esquerda para a direita Peso molecular de 1Kb, J96 (controle positivo), C600 (controle negativo), DV 001, DV 003, DV 012, DV 015, DV 016, DV 018, DV 020, DV 028, DV 031.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Figura 11 – Expressão de hemolisina- α em placas de ágar sangue das seguintes amostras: coluna 1 de cima para baixo U441 (controle positivo), DV 001, DV 003, DV 012, DV 015; coluna 2 de cima para baixo DV 016, DV 018, DV 020, DV 028, DV 031.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

As amostras com maior número de fatores de virulência aparecem em sua maioria no grupo filogenético B2, onde observamos que 76% das amostras desse grupo foram positivas para o marcador genético da fímbria P e 43% para o marcador da fímbria do tipo S (Tabela 8). No grupo B2 58% das amostras foram capazes de produzir Hemolisina- α e 18% foram positivas para o marcador genético da toxina Pic. Dentro do grupo filogenético D, 43,37% foram positivas para *pap* e 25% para *sfa*. Entre as amostras do grupo D, 9% foram capazes de produzir Hemolisina- α e foram positivas para *hly*, todavia apenas 4,43% apresentaram *pic*. Quanto ao grupo filogenético A onde se encontra a maior parte das amostras comensais, 36% das amostras foram positivas para *pap*, e somente 1% apresentou o *pic*. Apesar de 16% das amostras desse grupo apresentar *hly*, apenas 10% das amostras produziram Hemolisina- α . Provavelmente essa diferença esteja relacionada à variabilidade genética que pode existir no marcador *hly* entre as cepas de *E. coli* produtoras de Hemolisina- α (BERGER et al., 1982; MULLER et al., 1983) (Tabela 8).

O grupo filogenético B1 foi o que apresentou menor número de marcadores de virulência, sendo que além dos marcadores *fimA* e *fimH*, presentes em todas as amostras analisadas, o único marcador de virulência presente nesse grupo foi o *pap* com prevalência de 20% (Tabela 8).

Tabela 8 – Fatores de virulência das amostras de *E. coli* uropatogênicas relacionado ao grupo filogenético.

Fatores de virulência	Grupo filogenético			
	A	B1	B2	D
<i>fimA</i>	19/90	10/90	38/90	23/90
<i>fimH</i>	19/90	10/90	38/90	23/90
<i>Pap</i>	7/48	2/48	29/48	10/48
<i>Sfa</i>	6/29	0/29	17/29	6/29
<i>Pic</i>	1/29	0/29	7/29	1/29
Hemolisina- α	2/26	0/26	22/26	2/26
<i>hlyA</i>	3/19	0/19	15/19	1/19

Nº de cepas com o marcador/Nº total de cepas

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Quanto à relação entre os marcadores genéticos de virulência com o quadro clínico dos pacientes, observamos que independente do quadro, todas as amostras apresentaram os dois marcadores genéticos para fímbria do tipo I, (*fimA* e *fimH*). Com exceção do quadro clínico de cistite com má-formação, onde a prevalência do marcador *pap* foi de 44%, todos os outros grupos clínicos apresentaram uma prevalência de *pap* maior ou igual a 50% (Tabela 9).

O marcador genético para *pic* foi o que apareceu em menor porcentagem em todos os quadros clínicos, sendo que, esse marcador não foi encontrado em nenhuma amostra de pacientes com cistite recorrente ou pielonefrite. Esses resultados indicam que a presença de Pic, que é uma toxina com atividade mucinogênica muito importante para *E. coli* enteroagregativa (HENDERSON et al., 1999), não é fundamental para a indução de infecção urinária

Os pacientes com cistite e déficit miccional foram os que apresentaram a maior porcentagem (50%) de amostras positivas para Hemolisina- α e para o marcador genético *hly*. No entanto, as amostras de pacientes com cistite e aparelho urinário normal, cistite com má-formação, cistite recorrente com má-formação e pielonefrite apresentaram individualmente, uma prevalência maior do fenótipo de Hemolisina- α do que seu marcador genético *hly*.

Em resumo, os resultados mostraram que independente da fímbria tipo I, presente em todas as amostras de *E. coli* testadas, houve uma grande variação no número de marcadores de virulência

em relação a cada quadro clínico analisado, sugerindo que, a adesão e a colonização de *E. coli* no trato urinário para o estabelecimento da infecção é multifatorial.

Tabela 9 – Prevalência dos fatores de virulência de *E. coli* em diferentes quadros clínicos de ITU.

Quadro clínico	Fatores de virulência						
	fimA	fimH	papA	Sfa	Pic	Hemolisina-α	hly
Cistite aparelho urinário normal	28/28	28/28	14/28	8/28	5/28	11/28	9/28
Cistite com déficit miccional	6/6	6/6	3/6	4/6	1/6	3/6	3/6
Cistite com má-formação	18/18	18/18	8/18	7/18	1/18	4/18	3/18
Cistite aparelho urinário normal recorrente	6/6	6/6	4/6	4/6	0/6	1/6	0/6
Cistite recorrente com má-formação	23/23	23/23	13/23	4/23	2/23	4/23	2/23
Pielonefrite	9/9	9/9	6/9	2/9	0/9	3/9	2/9

Nº de cepas com o marcador/Nº total de cepas

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

4.4.4 Perfil de resistência das amostras

Nossos resultados mostraram que 52,22% das amostras de *E. coli* foram resistentes a dois ou mais antibióticos, 21,11 % foram resistentes a 1 antibiótico e 26,67 % foram sensíveis a todos os antibióticos testados (Gráfico 13). O antibiótico cujas bactérias demonstraram maior resistência foi a ampicilina (60 %), seguida pela nitrofurantoina (29 %), sulfazotrim (22 %) e cefalosporinas de 3^o geração (18 %) (Tabela 10).

Gráfico 13 – Perfil de resistência a agentes antimicrobianos da coleção de UPEC (N = 90).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

O perfil de resistência das amostras de *E. coli* foi relacionado com os quadros clínicos de cistite e pielonefrite dos pacientes através do teste de Mann-Whitney. Os resultados mostraram que as amostras de pielonefrite demonstraram maior resistência aos antimicrobianos do que as amostras de cistite ($p < 0,05$). Esses dados estão de acordo com a literatura científica que indica que amostras mais resistentes tendem a ser menos virulentas e amostras mais virulentas tendem a ser menos resistentes (JOHNSON et al., 2004; CHERIFI et al., 1990; HOUDOIN et al., 2008). Podemos visualizar esses resultados no gráfico 14 que mostra uma maior porcentagem de amostras resistentes a antibióticos em pacientes com quadro clínico de pielonefrite.

Gráfico 14 – Perfil de resistência a agentes antimicrobianos da coleção de UPEC (N = 90) separados entre Pielonefrite (N = 9) e Cistites (N = 81).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Tabela 10 – Perfil de resistência a agentes antimicrobianos de *E. coli* em diferentes quadros clínicos de ITU.

Quadro clínico	Classes de antibióticos									
	CT	C3	AP	PIB	CA	NT	F	ATM	CLO	ST
Pielonefrite	2/9	4/9	7/9	2/9	2/9	6/9	3/9	1/9	4/9	3/9
Cistite	3/81	15/81	48/81	7/81	4/81	24/81	11/81	1/81	13/81	18/81
Total	5/90	19/90	55/90	9/90	6/90	30/90	14/90	2/90	17/90	21/90
Cistite aparelho urinário normal	1/28	2/28	14/28	1/28	1/28	5/28	1/28		4/28	7/28
Cistite com déficit miccional	1/6	3/6	5/6	2/6	2/6	2/6	2/6		1/6	1/6
Cistite com má-formação	1/18	2/18	7/18	2/18	1/18	7/18	2/18		2/18	2/18
Cistite aparelho urinário normal recorrente		4/6	6/6	1/6		1/6	3/6	1/6	2/6	4/6
Cistite recorrente com má-formação		4/23	16/23	1/23		9/23	3/23		4/23	4/23
Total	3/81	15/81	48/81	7/81	4/81	24/81	11/81	1/81	13/81	18/81

Nº de cepas resistentes/Nº total de cepas

CT – ceftoxitina,

C3 – Cefalosporinas de 3ª geração (CAZ – Ceftazidima, CTX – cefotaxima, CRO – ceftriaxona)

AP – Ampicilina,

PPT – piperacilina/tazobactam,

CA – Carbapenêmicos (IPM – imipenem, MPM – meropenem);,

NT – nitrofurantoína,

F – Fluoroquinolonas (CIP – Ciprofloxacina, LEV – levofloxacina, NOR – norfloxacina)M –

Monobactâmicos,

A – Aminoglicosídeos (AM – Amicacina, GN – gentamicina),

ST – Sulfonamidas/trimetopim.

ATM – aztreonam;

CLO – cloranfenicol;

ST – Sulfonamidas e Trimetopim (SFT – sulfometaxol/trimetopim).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre a resistência das amostras bacterianas e os grupos filogenéticos B1, B2 e D, cuja prevalência de patógenos resistentes a um ou mais antibióticos variou entre 78 % a 80 %. Todavia um número menor de patógenos resistentes a um ou mais antibióticos foi encontrado no grupo A (52 %) (Gráfico15).

Gráfico 15 – Perfil de resistência a agentes antimicrobianos da coleção de UPEC (N = 90) separados entre Pielonefrite (N = 9) e Cistites (N = 81).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

4.4.5 Sorotipagem

Os sorogrupos de *E. coli* são muito utilizados em epidemiologia das infecções urinárias, para demonstrar as principais bactérias causadoras desta infecção. Os principais sorogrupos responsáveis por ITU são: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 e O75 (BIDET et al., 2007; JOHNSON, 1991; LLOYD et al., 2007; ORSKOV et. al., 1982;). Neste estudo cerca de 19 % das amostras não foram tipáveis, mesmo tendo sido a tipagem realizada contra todos os sorogrupos de *E. coli*. Esses resultados indicam que existem variantes novas de patógenos responsáveis por ITU cujo sorotipo ainda não foi identificado (Gráfico 16). Entre os sorogrupos mais encontrados encontram-se o O2, O6 e o OR. Existe na literatura uma grande variação regional entre a prevalência dos sorogrupos de UPEC. Todavia, vale a pena salientar que um dos sorogrupos mais importantes de UPEC, o sorotipo O25 não foi encontrado entre as amostras analisadas em nosso trabalho.

Gráfico 16 – Sorogrupos encontrados nas amostras de UPEC (N=90).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Quanto aos fatores de virulência, a maior parte das amostras com maior número de marcadores de virulência se encontraram nos grupos O2, O6 e O18, que fazem parte dos principais sorogrupos de UPEC e o grupo ONT, cujas amostras não foram tipáveis (Tabela 14). O mesmo foi observado quanto a resistência bacteriana a agentes antimicrobianos em relação aos grupos filogenéticos (Tabela 15). Todavia, os seguintes sorogrupos: O115, O153 e OR também mostraram um alto grande de resistência a agentes antimicrobianos.

Tabela 14 – Sorogrupo das amostras de *E. coli* uropatogênicas relacionado aos fatores de virulência.

Sorogrupos	Fatores de virulência						
	<i>fimA</i>	<i>fimH</i>	<i>Pap</i>	<i>sfa</i>	<i>pic</i>	<i>Hly</i>	Hemolisina-α
O1	1/1	1/1	1/1				
O2	14/14	14/14	8/14	5/14	4/14	9/14	11/14
O6	11/11	11/11	8/11	7/11	2/11	6/11	10/11
O7	2/2	2/2	2/2				
O8	1/1	1/1	0/1				
O16	6/6	6/6	6/6	2/6			
O18	2/2	2/2	2/2	1/2		½	1/2
Principais sorogrupos de UPEC (O1, O2, O6, O7, O8, O16 e O18)	37/37	37/37	27/37	15/37	6/37	16/37	22/37
O11	1/1	1/1					
O15	1/1	1/1			1/1		
O20	4/4	4/4	2/4	2/4			1/4
O33	1/1	1/1			1/1	1/1	
O34	2/2	2/2	½				
O80	4/4	4/4	4/4				
O86	3/3	3/3	1/3				
O115	1/1	1/1					
O141	1/1	1/1		1/1			
O153	5/5	5/5	2/5	1/5			1/5
O177	2/2	2/2					
ONT	17/17	17/17	7/17	3/3	1/1	2/2	2/2
OR	11/11	11/11	4/11	7/11			
Outros sorogrupos fora os principais	53/53	53/53	21/53	14/53	3/53	3/53	4/53

Nº de cepas com o marcador/Nº total de cepas

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Tabela 15 – Sorogrupo das amostras de *E. coli* uropatogênicas relacionado a resistência das amostras.

Sorogrupos	Classes de antibióticos									
	CT	C3	AP	PIB	CA	NT	F	ATM	CLO	ST
O1			1/1							
O2	2/14	3/14	8/14	3/14	2/14	3/14	3/14	2/14	4/14	3/14
O6		2/11	6/11	2/11		3/11	2/11		1/11	3/11
O7			2/2							
O8										
O16			2/6					1/6	1/6	1/6
O18		1/2	2/2	1/2	1/2		1/2		½	
Principais sorogrupos de UPEC (O1, O2, O6, O7, O8, O16 e O18)	2/37	6/37	21/37	6/37	3/37	6/37	6/37	3/37	7/37	7/37
O11						1/1				
O15						1/1				
O20			3/4			1/4				2/4
O33			1/1			1/1				
O34			1/2			2/2				
O80			4/4			2/4				2/4
O86		1/3	2/3			2/3				
O115		1/1	1/1	1/1		1/1	1/1		1/1	
O141										
O153	2/5	2/5	5/5		1/5	2/5	2/5	1/5	1/5	1/5
O177		1/2	2/2	1/2		1/2	1/2			
ONT		5/17	10/17		1/17	6/17	2/17	1/17	4/17	6/17
OR	1/11	3/11	5/11	1/11	1/11	4/11	2/11	1/11	4/11	3/11
Outros sorogrupos fora os principais	3/53	13/53	34/53	3/53	3/53	24/53	8/53	3/53	10/53	14/53

Nº de cepas resistentes/Nº total de cepas

CT – ceftoxitina,

C3 – Cefalosporinas de 3ª geração (CAZ – Ceftazidima, CTX – cefotaxima, CRO – ceftriaxona)

AP – Ampicilina,

PPT – piperacilina/tazobactam,

CA – Carbapenêmicos (IPM – imipenem, MPM – meropenem);,

NT – nitrofurantoína,

F – Fluoroquinolonas (CIP – Ciprofloxacina, LEV – levofloxacina, NOR – norfloxacina)M –

Monobactâmicos,

A – Aminoglicosídeos (AM – Amicacina, GN – gentamicina),

ST – Sulfonamidas/trimetopim.

ATM – aztreonam;

CLO – cloranfenicol;

ST – Sulfonamidas e Trimetopim (SFT – sulfometaxol/trimetopim).

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Além dos antígenos O (sorogrupos) também foi determinado o antígeno H dessas amostras de UPEC, os quais em conjunto com o antígeno O determinam o sorotipo das amostras. O sorotipo das amostras de UPEC não é utilizado em estudos epidemiológicos como os sorogrupos. Porém em amostras de *E. coli* diarreio gênicas os sorotipos são utilizados em estudos de surtos, pois ajudam na

determinação da origem clonal de uma amostra. Nesse trabalho 46 sorotipos diferentes foram encontrados , sendo que os principais foram o ONT:HNT – 7,78% e o O2:H1 – 6,67%. Houve um número considerável de sorotipos (8 sorotipos diferentes) sem flagelo – 15,56% das amostras (H-) (Tabela 16).

Tabela 16 – Distribuição dos sorotipos encontrados nas 90 amostras de UPEC caracterizadas.

Sorotio	N (%)	Sorotipo	N (%)	Sorotipo	N (%)
O1:H7	1 (1,11)	O20:H1	1 (1,11)	ONT:H-	1 (1,11)
O2:H-	2 (2,22)	O20:H9	2 (2,22)	ONT:H5	1 (1,11)
O2:H1	6 (6,67)	O20:HNT	1 (1,11)	ONT:H18	4 (4,44)
O2:H4	2 (2,22)	O33:H28	1 (1,11)	ONT:H21	1 (1,11)
O2:H6	4 (4,44)	O34:H14	1 (1,11)	ONT:H25	1 (1,11)
O6:H-	3 (3,33)	O34:HNT	1 (1,11)	ONT:H31	1 (1,11)
O6:H1	4 (4,44)	O80:H26	4 (4,44)	ONT:H33	1 (1,11)
O6:H31	4 (4,44)	O86:H18	3 (3,33)	ONT:HNT	7 (7,78)
O7:H-	2 (2,22)	O115:H10	1 (1,11)	OR:H-	2 (2,22)
O8:H8	1 (1,11)	O141:H-	1 (1,11)	OR:H1	2 (2,22)
O11:H8	1 (1,11)	O153:H2	2 (2,22)	OR:H2	2 (2,22)
O15:H1	1 (1,11)	O153:H10	1 (1,11)	OR:H9	1 (1,11)
O16:H-	1 (1,11)	O153:H18	1 (1,11)	OR:H10	1 (1,11)
O16:H5	3 (3,33)	O153:H31	1 (1,11)	OR:H18	2 (2,22)
O16:H6	2 (2,22)	O177:H21	2 (2,22)	OR:H23	1 (1,11)
O18:H-	2 (2,22)				

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

4.4.6 Adesão a células Vero

As amostras de UPEC foram testadas quanto a sua capacidade de aderir as células epiteliais. Os resultados mostraram que a maior parte das amostras testadas foi capaz de aderir às células Vero de origem renal (78,89%) (Tabela 17). Apenas um pequeno grupo das amostras não demonstrou capacidade de aderir nem as células e nem a lamínula 18,9%.(Tabela 17) (Figura 12).

Figura 12 – Capacidade de formação de adesão á células Vero de 10 amostras (DV 003, DV 016, DV 018, DV 026, DV 032, DV 033, DV 042, DV 044, DV 069 e DV 106) a amostra J96 como controle positivo e os controles celulares nos tempos de incubação de 2 e 3 horas.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Além da adesão foi observado que alguns isolados causam morte celular (Tabela 17).

Tabela 17 – Adesão a células Vero demonstradas pelas 90 amostras de UPEC caracterizadas

Comportamento das células	Período de incubação	
	2 horas	3 horas
Aderentes a células*	69 (76,67)	69 (74,44)
Aderentes a lamínulas	20 (22,22)	22 (24,44)
Aderentes só a lamínulas	12 (13,33)	6 (6,67)
Não aderentes	21 (18,9)	21 (2,22)
Poucas células mortas	4 (4,44)	3 (3,33)
Muitas células mortas	25 (27,78)	41 (45,55)

* 2 isoladas foram aderentes em 2 horas e não havia mais nenhuma célula viva em 3 horas e 2 isolados só foram aderentes em 3 horas demonstrando um total de 71 (78,89%) amostras aderentes a células Vero.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Quanto a capacidade de adesão em relação a o grupo filogenético, os resultados mostraram que a maior capacidade de adesão foi encontrada nos isolados pertencentes ao grupo filogenético A (94,74 %), seguido pelo B1 (90 %) e D (86,96 %). Todavia, o grupo B2, onde se encontra a maior parte das amostras virulentas foi o que demonstrou menor capacidade de adesão (63,16 %) (Tabela 18). Esse fato pode estar relacionado com a capacidade das bactérias encontradas nesse sorogrupo causar morte celular.

Tabela 18 – Capacidade de adesão a células Vero demonstradas pelas 90 amostras de UPEC caracterizadas divididas pelo grupo filogenético das amostras

Grupo filogenético	Capacidade de adesão celular	
	Aderentes	Não aderentes
A	18/19	1/19
B1	9/10	1/9
B2	24/38	14/38
D	20/23	3/23
Total	71/90	19/90

Nº de cepas com o marcador/Nº total de cepas

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Os principais sorogrupos de UPEC foram os que demonstraram menor capacidade de adesão a células Vero (64,86%), em relação aos demais sorogrupos (88,68%) (Tabela 19).

Dentre os sorogrupos mais isolados em nosso estudo encontramos os sorogrupos O2 (57,14%) e O6 (36,36%), sendo o O6 menos aderente que o O2, e ambos foram menos aderentes que o ONT (88,24%) e OR (100,00%), o sorogrupo OR foi o mais aderente.

Tabela 19 – Capacidade de adesão celular dos diferentes sorogrupos de UPC

Sorogrupos	Capacidade de adesão celular	
	Aderentes	Aderentes
O1	1/1	
O2	8/14	6/14
O6	4/11	7/11
O7	2/2	
O8	1/1	
O16	6/6	
O18	2/2	
Principais sorogrupos de UPEC (O1, O2, O6, O7, O8, O16 e O18)	24/37	13/37
O11	1/1	
O15	1/1	
O20	¾	¼
O33	1/1	
O34	2/2	
O80	4/4	
O86	2/3	1/3
O115	1/1	
O141	1/1	
O153	3/5	2/5
O177	2/2	
ONT	15/17	2/17
OR	11/11	
Outros sorogrupos fora os principais	47/53	6/53

Nº de cepas com o marcador/Nº total de cepas

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

4.4.7 Ensaios de formação de biofilme em superfícies abióticas: método indireto

A capacidade de formar biofilme das 90 amostras de UPEC foi quantificada pelo método do cristal violeta 0,5% com período de incubação por 24 horas em condições estáticas, que mede a formação de biofilme indiretamente por se ligar ao peptidoglicanos, moléculas de superfície negativamente carregadas e a polissacarídeos da matriz de células vivas e mortas. (LI et al., 2003).

O teste de formação foi realizado em duas superfícies poliestireno utilizado rotineiramente em ensaio em laboratório para formação de biofilme e PVC, material do qual é feito a maioria dos cateteres e sondas disponíveis no mercado brasileiro, (Gráfico 17 e Gráfico 18). Nossos resultados mostrarams que no PVC as UPEC formam menos biofilme que no poliestireno.

Gráfico 17 – Capacidade de formação de biofilme de 45 amostras de UPEC e dos seguintes controles: J96, U441, 042 e DH5α, em poliestireno e pvc utilizando a metodologia do cristal violeta a 0,5%, após 24 horas de incubação.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Gráfico 18 – Capacidade de formação de biofilme de 45 amostras de UPEC e dos seguintes controles: J96, U441, 042 e DH5 α , em poliestireno e pvc utilizando a metodologia do cristal violeta a 0,5%, após 24 horas de incubação.

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

Os dois controles positivos UPEC, U441 e J96, demonstraram boa capacidade de formação de biofilme, porém algumas das amostras analisadas demonstram maior capacidade de adesão que os controles positivos em ambas superfícies, PVC e poliestireno desde que foi estipulado que a formação de biofilme com uma densidade ótica abaixo de 0.5 em 595 nm é considerada fraca (Tabela 20).

Tabela 20 – Formação de biofilme em intervalos de DO a 595nm 90 amostras de UPEC da coleção de amostras uropatogênicas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

		Superfície de Poliestireno N(%)	Superfície de PVC N(%)
Controles	DH	0,033	0,021
	5α		
	042	0,389	0,361
	U4	1,162	0,764
	41		
UPEC	J96	1,240	1,250
	0 –		9
	0,500	4 (4,44)	(10,00)
	0,5		70
	01 – 1,000	62 (68,89)	(77,78)
	Aci		11
	ma 1,000	24 (26,67)	(12,22)

Fonte: (SILVA-JUNIOR, 2012)

5 CONCLUSÕES

A prevalência de ITU nas crianças de 0 a 16 anos de idade admitidas no Hospital Infantil Darcy Vargas entre setembro de 2008 a agosto 2009 foi de 16,98% sendo 10,23% pacientes masculinos e 5,75% pacientes femininos. A prevalência de ITU variou com a idade e o sexo do pacientes, sendo nos primeiros anos de vida maior em pacientes do sexo masculino.

O principal agente etiológico responsável por ITU foi *E. coli*, para ambos os sexos e as faixas etárias estudadas, seguida por *Proteus* spp. que foi predominante no sexo masculino.

Verificamos que a probabilidade de um paciente do sexo feminino ser infectado por *E. coli* ou *Staphylococcus* spp. foi respectivamente 3,04 e 6,95 vezes maior que um paciente do sexo masculino e a probabilidade de um paciente do sexo masculino estar infectado por *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. foi respectivamente 2,72 e 4,15 maior que um paciente do sexo feminino

O antibiótico que as bactérias Gram-negativas mostraram maior sensibilidade foi a cefalexina enquanto a maior resistência encontrada foi contra a ampicilina.

Noventa e um por cento das amostras de *Proteus* spp. foram resistentes a nitrofurantoína,

Cistite foi o quadro clínico predominante dos pacientes cujas amostras de *E. coli* foram analisadas.

O grupo filogenético predominante nas amostras de *E. coli* analisadas foi o B2.

Os resultados mostraram que independente da fimbria do tipo 1, essencial para o desenvolvimento de ITU, a grande variação de marcadores de virulência encontrada em relação a cada quadro clínico analisado, indica que a adesão e a colonização de *E. coli* no trato urinário para o estabelecimento da infecção é multifatorial.

As pielonefrites demonstram maior resistência que as cistites e menor virulência.

A maior parte das amostras pertenceram a sorogrupos, dos quais não fazem parte os sorogrupos principais (sendo que os não tipáveis não são realizados).

A maior parte das amostras tem uma capacidade de adesão as células Vero.

As amostras formam menos biofilme no PVC que no poliestireno, indicando que os cateters de PVC são mais seguros.

REFERÊNCIAS*

- ABDALLAH, K.S.; et al. Epidemiologic Investigation of Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) based on PCR phylogenetic group and *fimH* single nucleotide polymorphism (SNPs) in China. **Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.**, v. 2, p. 339-353, 2011.
- ABE, C.M.; et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 397-406, 2008.
- ANATOLIOTAKI, M.; et al. Antimicrobial resistance of urinary tract pathogens in children in Crete, Greece. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 39, p. 671-675, 2007.
- ANDERSON, G.G.; et al. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. **Microbes Infect.**, v.6, p. 1094-1101, 2004.
- ARSLAN, H.; et al. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community – acquired urinary tract infections in Turkey. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 56, p. 914-918, 2005.
- BERCION, R.; et al. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae uropathogens in Bangui, Central African Republic. **J Infect Dev. Countries**, v. 3, 187-190, 2009.
- BERGER, H.; et al. Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 152, p. 1241-1247, 1982.
- BEUTIN, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immunol.** v. 180, p. 167-182, 1991.
- BIDET, P.; et al. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. **J. Infect. Dis.** v. 196, p. 297-303, 2007.
- BINGEN, E.; et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 642-650, 1998.
- BLANCO, J.E.; et al. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2184-2185, 1997.
- BOWER J.M.; et al. Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. **Traffic.**, v. 6, p. 18-31, 2005.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR: 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Portaria no- 5, de 21 de fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, definem doenças de notificação

imediate, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 38, p. 34, 21 fev. 2006. Seção 1.

BUKH, A.S.; et al. *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 64, p. 163–1683, 2009.

CAMPOS, T.; et al. Infecção urinária na criança. **Acte Urol.**, v. 23, p. 19-23, 2006.

CARACCILO, A.; et al. Antimicrobial resistance among *Escherichia coli* that cause childhood community-acquired urinary tract infection in Northern Italy. **Ital. J. Pediatr.**, v. 37, 2011.

CHANG, S.L.; SHORTLIFFE, L.D. Pediatric Urinary Tract Infections. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 53, p. 379-400, 2006.

CHEN, S.L.; et al. Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 12879-12884, 2009.

CHERIFI, A.; et al. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from Human septicemia. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 70, p. 279-283, 1990.

CLERMONT, O.; et al. Rapid and simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

CULLER, H. F. **Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DAUTIN, N. Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and Function. **Toxins**, v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DIAS, R.C.S.; et al. Clonal Composition of *Escherichia coli* Causing Community-Acquired Urinary Tract Infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Microb. Drug Resist.**, v. 15, p. 303-308, 2009.

DUDLEY, E.G.; et al. An Inc11 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 74, , p. 2102-2114, 2006.

EMAMGHORASHI, F.; et al. The Prevalence of O Serogroups of *Escherichia coli* Strains Causing Acute Urinary Tract Infection in Children in Iran. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, v. 22, p. 597-601, 2011.

ENA, J.; et al. Risk factors for acquisition of urinary tract infections caused by ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. **J. Urol.**, v.153, p. 117–20, 1995.

EPARIS, C.M.; et al. Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na Cidade do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, p. 573-576, 2006.

EWERS, C., et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Int. J. Med. Microbiol.** v. 297, p. 163–176, 2007.

EWING, W.H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. New York:Elsevier., 1986.

FALCÃO, M. C.; et al. Urinary Tract Infection in Full-Term Newborn Infants: Risk Factor Analysis. **Rev. Hosp. Clín. São Paulo**, v.55, p. 9-16, 2000.

FOXMAN B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Am. J. Med.**, v. 113, p. 5S–13S, 2002.

FOXMAN, B.; et al.. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. **Ann. Epidemiol.**, v.10, p. 509–515, 2000.

FREEDMAN, A.L. Urologic diseases in North America Project: trends in resource utilization for urinary tract infections in children. **J. Urol.**, v. 173, p. 949–954, 2005.

GALESAA, A.; et al. Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **SENTRY**, v. 44, p. 289-299, 2002.

GARAU, J.; et al. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p. 2736-2741, 1999.

GIBREEL, T.M.; et al. Population structure, virulence potencial and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. **J. Antimicrob. Chemother.**, 2011.

GOETTSCH, W.; et al. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in The Netherlands. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, p. 223–228, 2000.

GUIDONI, E.B.M.; et al. Antibiotic Resistance Patterns of Pediatric Community-Acquired Urinary Infections. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12(4), p.321-323, 2008.

GUIDONI, E.B.M.; TOPOROVSKI, J. Infecção urinária na adolescência. **J. Pediatr.**, v. 77, p. 165-169, 2001.

GÜNDOĞDU, A.; et al. Antimicrobial resistance and distribution of *sul* genes and integron-associated *intI* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. **J. Med. Microb.**, v. 60, p. 1633-1642, 2011.

GUPTA, K.; et al. Patient-Initiated Treatment of Uncomplicated Recurrent Urinary Tract Infections in Young Women. **Ann. Internal Med.**, v. 135, p. 9-16, 2001.

HANCOCK, V.; KLEMM, P. Global Gene Expression Profiling of Asymptomatic Bacteriuria *Escherichia coli* during Biofilm Growth in Human Urine. **Infect. Immun.**, v.75, p. 966-976, 2007.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – ITU. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, p. 109-116 2003.

HENDERSON, I. R.; et al. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enterococcal *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, p. 5587–5596, 1999.

HERNANDES, R. T.; et al. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the Bundle-Forming Pilus. **J. Clin. Microb.**, v. 44, p.4214-17, 2006.

HERZER, P. J.; et al. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

HOOTON, T. M.; STAMM, W.E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.11, p. 551-581, 1987.

HÖRNER, R.; et al. Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria. **RBAC**. v. 38, p.147-150, 2006.

HOUDOUIN, V.; et al. Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 748-751, 2006.

HULTGREN, S.J.; NORMARK, S. Biogenesis of the bacterial pilus. **Curr. Opinion Genet. Devel.**, v. 1, n. 3, p. 313–318, 1991.

JADHAV, S.; et al. Virulence Characteristics and Genetic Affinities of Multiple Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* from a Semi Urban Locality in India. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 80-128, 1991.

JOHNSON, J. R.; et al. Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistance and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 15, p. 1739-1744, 2004

JOHNSON, J. R.; et al. Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, *iha* and *iron* *E. coli*, among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis. **Infect. Immun.**, v. 68(5), p. 3040–3047, 2000.

KANTOR, A. F.; et al. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. **Am. J. Epidemiol.**, v. 119, p. 510–515, 1984.

KAPER, J. B.; et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microb.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARLOWSKY, J. A.; et al. Prevalence of antimicrobial resistance among urinary tract pathogens isolated from female outpatients across the US in 1999. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.18, p. 121–127, 2001.

KARLOWSKY, J. A.; et al. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 2540–2545, 2002.

KASHEF, N.; et al. Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran, Iran. **J. Infect. Dev. Ctries**, v. 4, p. 202-206, 2010.

KOCH, V. E.; ZUCCOLOTTO, S. M. C. Infecção do trato urinário. Em Busca das Evidências. **J. Pediatr.** v.79, p. S97-S106, 2001.

KROGFELT, K. A.; et al. Direct evidence that the FimH protein is the mannose specific adhesin of *Escherichia coli* type 1fimbriae. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 1995–1998, 1990.

KWAN, C. W.; ONYETT, H. Community-acquired urinary tract pathogens and their resistance patterns in hospitalized children in southeastern Ontario between 2002 and 2006. **Paediatr. Child. Health**, v. 13, p. 759-762, 2008.

LI, W.W.; et al. Examination of urogenital tract microorganism infection and antibiotic susceptibility test. **Bull. Hunan Med. Univ.**, v. 28, p. 269-271, 2003.

LLOYD, A.L.; et al. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 3532–3546, 2007.

LOURENÇO, D.M.L.; et al.. Prevalence of urinary tract infections in children of Hospital Ana Costa. **Rev. Méd. Ana Costa**. v. 10., p. 23-25, 2005.

MANGES, A.R.; et al. Widespread distribution of urinary tract infection caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, p. 1007-1013, 2001.

MARANGONI, D.V.; MOREIRA, B.M. **Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica**. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. 1994.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, v. 351, p. 797-799, 1998.

MASHOUF, R.Y.; et al. Urinary tract infections: bacteriology and antibiotic resistance patterns. **Ind. Ped.**, v. 15, p. 1-4, 2009.

MCBEAN, M.; RAJAMANI, S. Increasing rates of hospitalization due to septicemia in the US elderly population, 1986–97. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 596–603, 2001.

MILKMAN, R. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. **Science**, v. 182, p. 1024–1026, 1973.

MLADIN, C.; et al. Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with neurogenic bladder. **Rom. Biotechnol. Letters**, v. 14, p. 4900–4905, 2009.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microb. Rev.**, v. 19, p. 25–52, 1996.

MOLINA-LÓPEZ, J.; et al. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 5, p. 840–849, 2011.

MULLER, D.; et al. Relationship between plasmid and chromosomal hemolysin determinants of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 153, p. 846–851, 1983.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14, 2004.

NETO, J.A.D.; et al. Community acquired urinary tract infection: etiology and bacterial susceptibility. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, p. 33–36, 2003.

NORINDER, B.S.; et al. Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? **Microb. Pathog.**, v. 52, p. 10–16, 2012.

NOWROUZIAN, F. et al. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover and virulence gene carriage. **Pediatr. Res.**, v. 54, p. 8–14, 2003.

OLIVEIRA, F.A.; et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Gen. Mol. Res.** 2011.

ORSKOV, I.; et al. O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. **Scan. J. Infect. Dis.**, v. 33, p. 18–25, 1982.

PIATTI, G.; et al. Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: phylogenetic background and quinolone resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 480–487, 2008.

PICARD, B.; et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** v. 67, p. 546–553, 1999.

PIRES, M. C. S.; et al. Prevalência e suscetibilidade bacterianas das infecções do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Rev. Soc. Med. Trop.**, v. 40, p. 643–647, 2007.

POLETTI, K.Q.; REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 416-420, 2005.

PUPO, G.M.; et al. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2685-2692, 1997.

QURESHI, A.M. Organisms causing urinary tract infection in pediatric patients at Ayub Teaching Hospital Abbottabad. **J Ayub. Med. Coll. Abbottabad.** v. 17, p. 72-74, 2005.

RAMOS, N.L.; et al. Characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* from children with urinary tract infection in different countries. **Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.**, v. 30, p. 1587-1593, 2011.

REGUA-MANGIA, A. H.; et al. Molecular characterization of uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **J. Basic Microb.**, v. 50, p. S107-S115, 2010. Supplement.

RIYUZO, M. C.; et al. Fatores associados à recorrência da infecção do trato urinário em crianças. **Ver. Bras. Saúde Materno Infantil.** v., 7, p. 151-157, 2007.

ROCHA, S. P.; et al. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51(2), p. 319-326, 2007.

RUSO, T. A.; et al. Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. **J. Infect. Dis.** v. 172, p. 440-445, 1995.

RUSO, T. A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SADLER, I.; et al. A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. **J. Cell. Biol.**, v. 109, p. 2665-2675, 1989.

SELANDER, R. K.; et al. Genetic Relationships and Clonal Structure of Strains of *Escherichia coli* Causing Neonatal Septicemia and Meningitis. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 213-222, 1986.

SELANDER, R. K.; LEVIN, B.R. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. **Science**, v. 210, p. 545-547, 1980.

SIEGMAN-IGRA, Y.; et al. Reappraisal of community-acquired bacteremia: a proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 1431-1439, 2002.

SOTO, S.M.; et al. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microb. Infect.**, v. 12, 1021-1045, 2006.

STAMM, W. E.; NORRBY, R. S. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **J. Infect Dis.**, v. 183, p. S1-S4, 2001.

- SVANBORG, S.; GODALY, G. Bacterial virulence in urinary tract infection. **Infec. Dis. Clin. North Am.**, v. 11, p. 513-529, 1997.
- TANEJA, N.; et al. Pediatric urinary tract infections in a tertiary care center from north India Indian. **J. Med. Res.**, v. 131, p. 101-105, 2010.
- TAPIAINEN, T.; et al. Biofilm formation and virulence of uropathogenic *Escherichia coli* in urine after consumption of cranberry-lingonberry juice. **Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.**, 2011.
- TENAILLON, O.; et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microb.** v. 8, p. 207-217, 2010.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo:Atheneu., 2004.
- TRAMUTA, C.; et al. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. **J. Vet. Sci.**, v. 12, p. 49-55, 2011.
- UPTON, D. A.; et al. Risk factors for resistance of “first-line” antimicrobial among urinary tract isolates of *Escherichia coli* in children. **JAMC**, v. 160, p. 1436-1440, 1999.
- WELCH, R. A. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 521–528, 1991.
- WILES, T. J.; et al. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp. Mol. Pathol.** v. 85, p. 11–19, 2008.
- WINBERG, J.; et al. Epidemiology of symptomatic urinary tract infection in childhood. **Acta Paediatr. Scand.** , v. 252, p. 1-20, 1974.
- YAMAMOTO, S.; et al. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Med. Microb.** v.12, p. 85–90, 1995.
- YILMAZ, N.; et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *E. coli* in outpatient urinary isolates in Izmir, Turkey. **Med. Sci. Monit.**, v. 15, p. 161-165, 2009.
- YÜKSEL, S.; et al. Antibiotic resistance of urinary tract pathogens and evaluation of empirical treatment in Turkish children with urinary tract infections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28, p. 413-416, 2006.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall International Inc.,1999, 718p.
- ZERVOS, M. J.; et al. Relationship between fluoroquinolone use and changes in susceptibility to fluoroquinolones of selected pathogens in 10 United States teaching hospitals, 1991–2000. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 1643–1648, 2003.

APÊNDICES

Apêndice A – Géis de agarose

Figura 13 – Gel 1 de agarose para o gene *fimA* das com o controle negativo, positivo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 14 – Gel 2 de agarose para o gene *fimA* das com o controle negativo, positivo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 15 – Gel 3 de agarose para o gene *fimA* das com o controle negativo, positivo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 16 – Gel 4 de agarose para o gene *fimA* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 17 – Gel 5 de agarose para o gene *fimA* das com o controle positivo, negativo e 5 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 18 – Gel 1 de agarose para o gene *fimH* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 19 – Gel 2 de agarose para o gene *fimH* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 20 – Gel 3 de agarose para o gene *fimH* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 21 – Gel 4 de agarose para o gene *fimH* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 22 – Gel 5 de agarose para o gene *fimH* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 23 – Gel 6 de agarose para o gene *fimH* das com o controle positivo, negativo e 5 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 24 – Gel 1 de agarose para o gene *papA* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 25 – Gel 2 de agarose para o gene *papA* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 26 – Gel 3 de agarose para o gene *papA* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 27 – Gel 4 de agarose para o gene *papA* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 28 – Gel 5 de agarose para o gene *papA* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 29 – Gel 6 de agarose para o gene *papA* das com o controle positivo, negativo e 5 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 30 – Gel 1 de agarose para o gene *sfa* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 31 – Gel 2 de agarose para o gene *sfa* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 32 – Gel 3 de agarose para o gene *sfa* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 33 – Gel 4 de agarose para o gene *sfa* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 34 – Gel 5 de agarose para o gene *sfa* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 35 – Gel 6 de agarose para o gene *sfa* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de 6UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 36 – Gel 1 de agarose para o gene *pic* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 37 – Gel 2 de agarose para o gene *pic* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 38 – Gel 3 de agarose para o gene *pic* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 39 – Gel 4 de agarose para o gene *pic* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 40 – Gel 5 de agarose para o gene *pic* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 41 – Gel 6 de agarose para o gene *pic* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 42 – Gel 1 de agarose para o gene *hly* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 43 – Gel 2 de agarose para o gene *hly* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 44 – Gel 3 de agarose para o gene *hly* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 45 – Gel 4 de agarose para o gene *hly* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 46 – Gel 5 de agarose para o gene *hly* das com o controle positivo, negativo e 17 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 47 – Gel 6 de agarose para o gene *hly* das com o controle positivo, negativo e 5 amostras de UPEC em ordem crescente.

Fonte: (SILVA JUNIOR, 2010)

Figura 48 – Placa de hemólise de 28 amostras de UPEC em ordem crescente.

Figura 49 – Placa de hemólise de 28 amostras de UPEC em ordem crescente.

Figura 50 – Placa de hemólise de 28 amostras de UPEC em ordem crescente.

Figura 51 – Placa de hemólise de 6 amostras de UPEC em ordem crescente.