

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ARTHUR HENRIQUE MENDES COLASSO

**Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* uropatogênica *pfc+*
isoladas de pacientes com infecção do trato urinário**

São Luís
2022

ARTHUR HENRIQUE MENDES COLASSO

**Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* uropatogênica *pic+*
isoladas de pacientes com infecção do trato urinário**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior

São Luís

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Colasso, Arthur Henrique Mendes.

Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* uropatogênica pic+ isoladas de pacientes com infecção do trato urinário / Arthur Henrique Mendes Colasso. - 2022.

53 p.

Orientador(a): Afonso Gomes Abreu Junior.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis- Ma, 2022.

1. Antimicrobianos. 2. Biofilme. 3. Infecção urinaria. 4. Pic. 5. *Tenebrio molitor*. I. Abreu Junior, Afonso Gomes. II. Título.

ARTHUR HENRIQUE MENDES COLASSO

Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* uropatogênica *pic+* isoladas de pacientes com infecção do trato urinário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Hivana Patricia Melo Barbosa Dall'Agnol
Universidade Federal do Maranhão

Luis Claudio Nascimento da Silva
Universidade Ceuma

“Explicar toda a natureza é uma tarefa difícil demais para qualquer homem ou para qualquer época. É muito melhor fazer um pouco e com certeza e deixar o resto para os outros que vem depois de você.”

Isaac Newton

Dedico aos meus pais Júlio Colasso
e Maria Colasso

AGRADECIMENTOS

À minha família: meu pai **Julio Colasso**, pessoa batalhadora que sempre fez de tudo para colocar seus filhos em ótimos instituições de ensino; minha mãe, **Maria Colasso**, pelo incentivo amor carinho e dedicação durante minha criação; meus irmãos, **Alexandre Colasso** e **Anna Colasso**, por me proporcionar momentos alegres durante essa jornada.

A meu orientador **Afonso Abreu**, por ter me aceito no grupo de pesquisa, por toda calma, conselhos, respeito e compreensão de sempre. És um profissional esplendido e um orientador maravilhoso. Sou grato demais por isso!

As pessoas pertencentes ao grupo de pesquisa GEPat em especial Jonathas, Lorena, Itaynara, Carlos, Marcos e a todos os outros colegas do laboratório pela motivação e risadas que fizeram desse mestrado uma coisa mais leve.

A família do laboratório de patogenicidade microbiana (LAPMIC) do CEUMA pelo acolhimento, aparato técnico, auxílio científico e instruções sempre quando necessário.

A FAPEMA pelo aparato financeiro que me deu a oportunidade de finalizar minha pesquisa no Instituto Butantan onde pude conhecer diversos profissionais de alto nível em especial o Prof. Dr. Waldir Elias Pereira Junior, que me supervisionou e conseqüentemente me fez aprender diversas técnicas que serão empregadas em futuros experimentos.

A universidade CEUMA e a todos os funcionários que fazem parte do corpo da instituição por disponibilizar os equipamentos necessários para realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão (PPGCS-UFMA) e a todos os excelentes professores que fazem parte dele, pela oportunidade e pelos conhecimentos passados a todos os alunos que almejam o título de mestre.

RESUMO

A infecção do trato urinário (ITU) é caracterizada pela presença de microrganismos que invadem os tecidos urinários, com presença de bactérias na urina em quantidade igual ou superior a 10^5 UFC/ml. É causada principalmente por enterobactérias, dentre as quais se destaca a *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), devido à presença de diversos fatores de virulência, a exemplo da produção de serinoproteases. Em bactérias Gram-negativas, as proteases pertencentes à família Enterobacteriaceae são conhecidas como SPATEs (*Serino protease autotransporter of Enterobacteriaceae*). Dentre as SPATEs, a proteína envolvida na colonização (Pic) tem grande relevância e é produzida tanto por patótipos de *E. coli* como por *Shigella flexneri* e *Citrobacter rodentium*. Pic é descrita na literatura por causar hemaglutinação, degradar mucina, clivar moléculas do sistema complemento, dentre outros. Desta forma, este trabalho tem como objetivo detectar o gene *pic* em *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de pacientes com infecção do trato urinário e realizar a caracterização fenotípica destes isolados. No período de dois meses o laboratório coletou 9.961 amostras de ITU das quais foram selecionadas 369 para realização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, seguido de PCR para caracterização de genes de virulência associados à produção de SPATEs. Foi verificado a capacidade destes isolados formarem biofilme utilizando a técnica do cristal violeta e posteriormente um teste de sobrevivência utilizando animais invertebrados (larvas de *Tenebrio molitor*) avaliada durante 10 dias. Das 369 amostras analisadas no estudo, quatro possuíram apenas o gene *pic*, dentre os genes de SPATEs pesquisados. O teste de sensibilidade das amostras indicou resistência a antibióticos utilizados em quadros de ITU, sendo estes da classe dos beta-lactâmicos, sulfonamidas e quinolonas. A presença do gene *pic* pode estar relacionado a capacidade de UPEC degradar muco e promover a colonização na mucosa do trato urinário. Os testes realizados demonstraram que as cepas que continham *pic* produziram quantidades de biofilme diferentes umas das outras sendo que a denominada ITU032 foi considerada um fraco formador de biofilme enquanto a cepa ITU015 produziu mais biofilme que o controle positivo 042, demonstrando que a patogenicidade do isolado possivelmente não está relacionada à quantidade de biofilme que ela pode produzir. No teste de sobrevivência utilizando larvas de *T. molitor* foi possível observar uma taxa de sobrevivência de 40% nas larvas infectadas com as cepas ITU014 e ITU040, com o maior índice de mortalidade naquelas infectadas com a cepa ITU015, com sobrevivência de apenas 10%. A cepa ITU32 demonstrou uma letalidade de 70%. Este método é mais rápido e econômico que os modelos murino e apresentam resultados mais relevantes que os ensaios baseados em células podendo ser utilizado para verificar se algum composto natural tem capacidade antibacteriana. De maneira geral este estudo demonstra que cepas de UPEC tem apresentado resistência a diversos antimicrobianos além de expressar o gene de virulência *pic* característico de EAEC. Novos ensaios estão em fase de conclusão com o objetivo de compreender o papel destas serinoproteases nas infecções urinárias e com isso buscar novos mecanismos para tratamento destas complicações.

Palavras-chave: *pic*; Infecção urinária; antimicrobianos; biofilme; *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI) is characterized by the presence of microorganisms that invade the urinary tissues, with the presence of bacteria in the urine in amounts equal to or greater than 10⁵ CFU/ml. It is mainly caused by enterobacteria, among which the uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) stands out, due to the presence of several virulence factors, such as the production of serine proteases. In Gram-negative bacteria, proteases belonging to the Enterobacteriaceae family are known as SPATEs (Serino protease autotransporter of Enterobacteriaceae). Among SPATEs, the protein involved in colonization (Pic) is of great relevance and is produced both by *E. coli* pathotypes and by *Shigella flexneri* and *Citrobacter rodentium*. Pic is described in the literature for causing hemagglutination, degrading mucin, cleaving complement system molecules, among others. Thus, this work aims to detect the *pic* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection and perform the phenotypic characterization of these isolates. In a two-month period, the laboratory collected 9,961 UTI samples, of which 369 were selected for the antimicrobial susceptibility profile, followed by PCR to characterize the virulence genes associated with the production of SPATEs. The ability of these isolates to form a biofilm was verified using the crystal violet technique and later a survival test using invertebrate animals (*Tenebrio molitor* larvae) was evaluated for 10 days. Of the 369 samples analyzed in the study, four had only the *pic* gene, among the SPATEs genes researched. The sensitivity test of the samples indicated resistance to antibiotics used in cases of UTI, which belong to the class of beta-lactams, sulfonamides and quinolones. The presence of the *pic* gene may be related to the ability of UPEC to degrade mucus and promote colonization in the urinary tract mucosa. The tests carried out showed that the strains containing *pic* produced different amounts of biofilm from each other, with the so-called ITU032 being considered a weak biofilm former, while the ITU015 strain produced more biofilm than the positive control 042, demonstrating that the pathogenicity of the isolate possibly it is not related to the amount of biofilm it can produce. In the survival test using *T. molitor* larvae, it was possible to observe a survival rate of 40% in larvae infected with strains ITU014 and ITU040, with the highest mortality rate in those infected with strain ITU015, with survival of only 10%. The UTI32 strain demonstrated a 70% lethality. This method is faster and more economical than murine models and presents more relevant results than cell-based assays and can be used to verify if any natural compound has antibacterial capacity. In general, this study demonstrates that UPEC strains have shown resistance to several antimicrobials, in addition to expressing the *pic* virulence gene characteristic of EAEC. New trials are nearing completion with the aim of understanding the role of these serine proteases in urinary infections and thereby seeking new mechanisms for treating these complications.

Keywords: *pic*; Urinary infection; antimicrobials; biofilm; *Tenebrio molitor*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEORICO	16
2.1	Infecção urinaria	16
2.2	<i>Escherichia coli</i>	18
2.3	Principais fatores de virulência de UPEC	20
2.4	Serinoproteases	22
2.5	Proteína envolvida na colonização (Pic).....	23
3	OBJETIVO.....	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Aspectos éticos	27
4.2	Coleta das amostras.....	27
4.3	Identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	27
4.4	Extração de DNA.....	27
4.5	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	28
4.6	Eletroforese em gel de agarose.....	28
4.7	Ensaio de Formação do Biofilme Bacteriano	28
4.8	Modelo de infecção <i>in vivo</i>	29
4.8.1	Ensaio de sobrevivência com larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	29
4.9	Análise Estatística	30
5	RESULTADOS	31
6	DISCUSSÃO	35
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
8	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41
	ANEXOS.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos Laboratoriais
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adesão difusa
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAS	Exame de urina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EspC	Proteína C secretada por EPEC
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enteroxigênica
EXPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal
HBP	Hemoglobina protease
ITU	Infecção do trato urinário
IRAS	Infecções relacionadas a assistência à saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pet	Proteína codificadora pelo plasmídeo
Pic	Proteína envolvida na colonização
Sat	Toxina autotransportadora secretada
SepA	Proteína extracelular de <i>Shigella</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SPATE	<i>Serino protease autotransporter of Enterobacteriaceae</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TSH	Hemaglutinina sensível a temperatura
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UTI	Unidade de terapia intensiva
Vat	Toxina autotransportadora vacuolizante

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras ITU014, ITU015, ITU032 e ITU040 obtido pelo método automatizado Vitek 2 e disco-difusão. O teste foi realizado de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards*

Institute.....32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de patótipos de <i>E. coli</i> e seus filo grupos correspondentes	19
Figura 2 – Classificação das SPATES	24
Figura 3 – Formação de biofilme entre os isolados	33
Figura 4 – Ensaio de sobrevivência de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	34

1 INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) ocorre quando um patógeno consegue invadir o tecido e colonizar o sistema urinário, onde a bactéria causadora da ITU ascende dos órgãos mais baixos (uretra) para os órgãos mais elevados (ureteres e rins), o principal agente responsável por esta infecção é *Escherichia coli* (FABBRI; PIRES, 2016; MALINOVSKI, 2021).

E. coli, apesar de ser predominantemente comensal, está comumente envolvida em uma grande quantidade de infecções alimentares e infecções extra intestinais, tais como: pneumonia, meningite e infecções relacionadas ao trato urinário. Esta última acontece principalmente devido ao fato de esta bactéria estar presente no microbioma intestinal e, conseqüentemente, afeta mais indivíduos do sexo feminino devido à proximidade anatômica da vagina com o ânus (GOMES et al., 2016).

Cepas de *E. coli* são responsáveis por cerca de 70 a 90% dos casos sintomáticos de infecções urinaria fora de UTIs (MASSON et al., 2009; BRESOLIN, 2016; COSTA et al., 2010). Isso se deve, principalmente, ao fato de que bactérias desta espécie possuem diversos fatores de virulência, tais como as fímbrias que auxiliam na aderência ao epitélio, adesinas, toxinas, proteínas autotransportadoras e sistema de aquisição de ferro (PEREIRA; CALHAU, 2016). Dentre as *E. coli*, as uropatogênicas são capazes de produzir biofilme, dificultando seu tratamento e levando a um maior tempo de internação causando um custo elevado nos cofres públicos (MOTA, 2011).

A presença de fatores de virulência em algumas cepas patogênicas de *E. coli*, a exemplo das serinoproteases, habilitam esses microrganismos a causar doenças cada vez mais graves em indivíduos saudáveis (BHULLAR et al., 2015; MAINIL, 2013). Serinoproteases são enzimas que possuem atividade proteolítica, sendo encontradas em diversos microrganismos (PAGE; Di CERA, 2008; DODSON; WLODAWER, 1998). Em bactérias Gram-negativas, as proteases pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são conhecidas como SPATEs (*serinoprotease autotransporter of Enterobacteriaceae*) (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014), sendo a proteína Pic um importante membro desta família. Dentre as cepas de *E. coli* produtoras de Pic se destacam a EAEC (*E. coli* enteroagregativa), UPEC (*E. coli*

uropatogênica) e EPEC (*E. coli* enteropatogênica) (HENDERSON et al., 1999; PARHAM et al., 2004; ABREU et al., 2016). Além de *E. coli*, outros patógenos são capazes de produzir Pic, a exemplo da *Shigella flexneri* e *Citrobacter* spp. (RAJAKUMAR et al., 1997; BHULLAR et al., 2015).

Diversas funções biológicas para Pic já foram descritas, das quais se destacam a hemaglutinação, atividade mucinolítica, degradação do fator V da cascata de coagulação e clivagem de glicoproteínas de superfície de leucócitos, que estão envolvidas no tráfico, migração e inflamação (RUIZ-PEREZ et al., 2011). Assim, Pic é capaz de clivar açúcares presentes no muco intestinal, facilitando, a adesão da bactéria à mucosa do intestino (ABREU et al., 2016; MUNERA et al., 2014; HARRINGTON et al., 2009), além de clivar diversos receptores presentes na superfície de leucócitos e moléculas do sistema complemento (RUIZ-PEREZ et al., 2011; ABREU et al., 2015), levando a complicações graves, a exemplo da sepse letal em animais infectados com *E. coli* produtora desta serinoprotease (DUTRA et al., 2020).

Diversas cepas de *E. coli*, entre elas UPEC, possuem inúmeros fatores de virulência responsáveis por causar quadros graves quando associado a doenças relacionado ao corpo humano, baseado nisso, este trabalho tem como objetivo detectar o gene *pic* em amostras isoladas de Infecção urinária, bem como realizar uma caracterização fenotípica destes isolados.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Infecção urinaria

A infecção do trato urinário (ITU) é caracterizada pela presença de microrganismos que invadem os tecidos urinários, devendo ser classificada segundo sua localização em infecção urinária baixa e alta. Define-se bacteriúria assintomática como o isolamento de bactérias na urina em quantidade igual ou superior a 10^5 unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL), não havendo assim sinais ou sintomas, a nível local ou sistêmico de infecção (FIHN, 2003).

A ITU é considerada como a infecção mais recorrente quando associado à assistência à saúde (IRAS), representando aproximadamente 40% das notificações em unidades de terapias intensivas (UTIs) (MOTA; OLIVEIRA., 2019). Muitos pacientes contraem uma reinfecção urinaria no decorrer do ano, sendo este quadro observado em 30% da população idosa, levando a ter um maior cuidado em indivíduos desta faixa etária, haja vista que estes dispõem de um sistema imune mais debilitado e em sua grande maioria possuem algum tipo de doença crônica (MARKS et al., 2020; MELO et al., 2017).

As infecções urinárias são manifestações comuns na infância, tendo sua prevalência em 5% de crianças do sexo feminino e 2% do masculino, afetando 35% de recém-nascidos. (GOMES; MAHLKE, 2013). O diagnóstico de ITU em crianças é considerado difícil pois quando ocorre, raramente são associados a sinais e sintomas típicos da doença (disúria, micção frequente, dor forte na lombar e polaciúria), sendo necessário um tempo maior para poder dar o diagnóstico da doença, levando, assim, a um custo mais elevado para o sistema de saúde pública (FELD; MATTOO, 2010; NETO et al., 2019).

Em relação ao gênero, ITUs afetam principalmente pacientes do sexo feminino na fase adulta, devido as mulheres terem em sua anatomia uma maior proximidade da uretra em relação ao ânus e vagina (AKRAM; KHAN, 2007). Cerca de 50% das mulheres apresentam infecções urinaria na vida, sendo que 25% das pacientes tem reincidência no mesmo ano (CAR, 2006). Este número é aumentando em pacientes que atingem a menopausa devido a redução da produção de estrogênio, aumento do pH vaginal e conseqüentemente desregulação

de *Lactobacillus*, levando assim a uma maior vulnerabilidade a bactérias e fungos tais, como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e, principalmente, *E. coli*, sendo necessário exames complementares para achar o patógeno causador do quadro de infecção (SMITH; RAVEL., 2017; ALDUNATE et al., 2015).

Para diagnóstico da infecção, inicialmente é realizado um exame de urina tipo I, também conhecido como exame EAS (Elementos Anormais do Sedimento), onde observa-se a presença de nitrito, sendo esse um indicativo de infecção urinária, entretanto somente a urocultura pode confirmar a presença ou não da infecção (FABBRI; PIRES, 2016). Através da urocultura é possível identificar o patógeno causador da infecção, sendo realizado posteriormente o antibiograma para determinar a sensibilidade da bactéria frente ao antibiótico (BAUER et al., 1966), levando a escolha do melhor fármaco para tratamento da infecção (RANGEL et al., 2013; HEILBERG, 2003).

Bactérias Gram-positivas são patógenos menos frequentes em casos de ITU. No entanto, ao longo dos anos, tem-se observado uma maior incidência destes microrganismos, chegando a causar quadros graves da doença, tendo como principal representante da categoria aquelas da família Micrococcaceae (SCHENKEL, 2014). O principal gênero pertencente a esta família, quando relacionado a doenças urinárias são os *Staphylococcus* spp., sendo o *Staphylococcus saprophyticus* a espécie mais descrita, principalmente quando relacionamos a mulheres jovens e sexualmente ativas (BRAOIOS, et al., 2009; BERALDO-MASSOLI et al., 2012).

Os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* são os maiores responsáveis pelo quadro de infecção urinária, sendo encontradas em 55% dos casos (COSTA et al., 2010; MIRANDA; CUNHA., 2016). Estes patógenos são Gram-negativos anaeróbios, e estão presentes na microbiota intestinal de animais de sangue quente, dentre os quais pode-se destacar os gêneros *Proteus*, *Klebsiella* e *Escherichia* como os maiores responsáveis por quadros de ITU em UTIs (COSTA et al., 2010).

E. coli é o agente etiológico mais frequente em quadros de ITU, sendo encontrada com frequência de 48% a 91% de casos de todo o mundo (BRESOLIN,

2016; COSTA et al., 2010; GONÇALVES et al, 2001). Isso se deve ao fato de que este patógeno está presente no microbioma intestinal e possui diversos fatores de virulência, tais como o *pili* que facilita a aderência do patógeno na mucosa vaginal, o antígeno H que auxilia na mobilidade de *E. coli* na infecção do trato urinário, o antígeno K que dificulta a ação de fagocitose mediada por neutrófilos e o antígeno O, responsável pela diminuição do peristaltismo, facilitando assim a ascensão da bactéria pelo trato urinário causando quadros mais graves da doença (FABBRI; PIRES, 2016).

2.2 *Escherichia coli*

No trato gastrointestinal se encontra o maior número de diversidade de bactérias que colonizam o corpo humano (LEITE *et al.*, 2014). O termo microbiota intestinal refere-se a uma diversidade de microrganismos vivos entre elas podemos citar as bactérias anaeróbias, que colonizam o intestino logo após o nascimento (PAIXÃO; CASTRO, 2016). Denominada anteriormente de flora, a microbiota do intestino é um conjunto de microrganismos que colonizam este órgão. As populações que constituem a microbiota são variáveis ao longo do trato digestório e localizam-se entre a mucosa e o lúmen intestinal, dentre elas o microrganismo que se encontra mais presente é *E. coli* (FERREIRA, 2014).

E. coli foi descoberta em 1885 pelo pediatra e microbiologista alemão Theodore Escherich na cidade de Napoli, primeiramente foi denominada de *Bacillus coli comune*. Porém, após um algum tempo foi renomeada para *E. coli* (SAUVONNET et al., 2000). É um bacilo Gram-negativo anaeróbico facultativo e não esporulado, capaz de causar morbi/mortalidades, principalmente em crianças menores que 5 anos (World Health Organization, 2016). A bactéria pode ser facilmente isolada de amostras fecais em meio de cultura seletivos cujo crescimento ideal é de aproximadamente 37 °C (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016).

Estudos filogenéticos de *E. coli* mostram que ela possui 4 filios grupos principais: A, B1, B2 e D. Essa caracterização, informa a qual linhagem um isolado de *E. coli* pertence. Estes diferentes grupos podem se diferenciar caso a *E. coli* seja comensal ou patogênica, sendo que *E. coli* comensais fazem parte dos grupos A e B1 e os patogênicos dos filogrupos B2 e D (CLERMONT et al, 2015).

Embora encontrada no intestino, a bactéria pode causar uma série de infecções intestinais e extra intestinais. Entre as cepas patogênicas de *E. coli* que causam doenças intestinais podemos citar: *E. coli* enteropatôgena (EPEC), *E. coli* enteroxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) (MAINIL, 2013), (FIGURA 1).

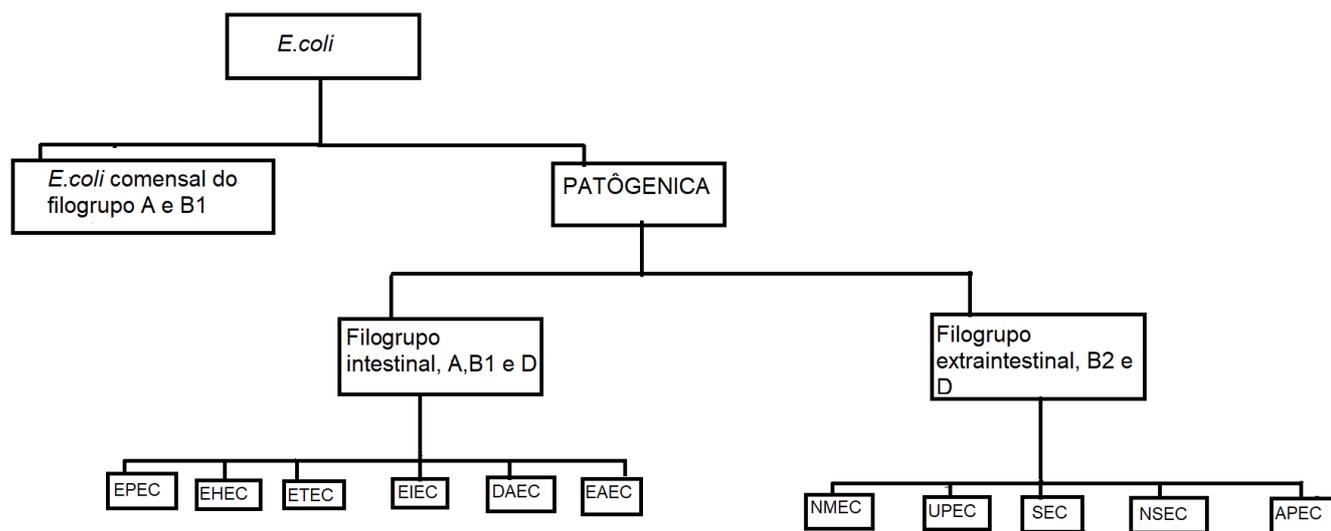


Figura 1: Representação esquemática de patótipos de *E. coli* e seus filogrupos correspondentes. EPEC: *E. coli* enteropatogênica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; ETEC: *E. coli* enterotoxigênica; EIEC: *E. coli* enteroinvasiva; DAEC: *E. coli* difusamente aderente; EAEC: *E. coli* uropatogênica; SEC: *E. coli* septicêmica; NSEC: *E. coli* septicêmica neonatal; APEC: *E. coli* patogênica aviária.

E. coli está presente na microbiota intestinal de animais de sangue quente, entretanto quando ocorre uma ruptura da barreira intestinal, *E. coli* pode invadir e migrar para o trato urinário, podendo eventualmente alcançar a corrente sanguínea e se disseminar para os mais diversos tecidos do hospedeiro, causando bacteremia e sepse (ABREU; BARBOSA, 2017). As linhagens que causam doenças fora do intestino são descritas como *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) (PATZIVARGAS et al., 2015).

As infecções urinárias recorrentemente são causadas por enterobactérias que conseguem migrar do intestino para o trato urinário, sendo a *E. coli* uropatogênica (UPEC) a causa mais comum, responsável por cerca de 80% das infecções (ULETT

et al., 2013). Um dos motivos deste patógeno ser capaz de causar grande índice de infecção está no seu perfil de virulência, sendo capaz de secretar toxinas e adesinas que facilitam sua adesão, locomoção e colonização no sistema urinário (MEUSKENS et al., 2019).

2.3 Principais fatores de virulência de UPEC

Os quadros de infecções urinárias em UTIs se agravam principalmente por genes de virulências presente em cepas de UPEC. Esse patógeno tem variabilidade genética extensa, o que impede a classificação em subtipos. Acredita-se que os genes são derivados da microbiota intestinal e passado com o decorrer dos anos através de transferência horizontal entre microrganismo da mesma espécie (JENSEN., 2014; SANTOS., 2018), tais características moleculares foram bem estabelecidas em alguns estudos (FLORES-MIRELES et al.,2015). Sua alta patogenicidade e prevalência nas UTIs são associadas a capacidade de bactérias deste gênero secretarem adesinas, toxinas e sideróforos, que levam ao agravamento da doença (BIEN et al., 2012).

Os fatores de virulência das UPEC têm como função ajudar na colonização na mucosa do sistema urinário, favorecendo alterações da superfície celular fazendo que ocorra fixação com as células do hospedeiro (SILVA et al., 2017). A aderência e colonização ocorre com a entrada da cepa de UPEC através da uretra, que por sua vez ascende através do sistema urinário migrando para a bexiga com finalidade de chegar até os rins, causando a pielonefrite (CHUNG et al, 2010). O processo de adesão bacteriana e colonização da mucosa do trato urinário é essencial para a bactéria se estabelecer no hospedeiro e causar o processo de infecção, para tal é necessário uma substancia denominada adesina que consegue se ligar a receptores localizados na bexiga. As adesinas são encontradas nas extremidades das fimbrias, as cepas de UPEC possuem de 10 a 12 fimbrias com variadas adesinas (FLORES-MIRELES et al., 2015; MOBLEY., 2016). Tal aderência auxilia a invasão bacteriana assim como a capacidade de formar biofilme que torna o patógeno mais resistente ao tratamento com antibióticos (CONNELL et al,1996; ETO et al, 2007).

A literatura já descreve que a formação de biofilme está diretamente associada a outros fatores de virulência das linhagens de *E. coli*, tais como, o *pili*

conjugativo, capacidade da bactéria produzir flagelo e ter polissacarídeos extracelulares (SANTOS, 2018). A presença de biofilme em infecções ocasionada por UPEC tem sido relacionada a casos que os pacientes são internados em leitos de UTIs e possuem um implante de prótese ou a presença de sondas e cateteres. O combate de biofilmes visíveis se deve através de remoção mecânica, remoção química e principalmente pelo uso de antimicrobianos, sendo utilizado em alguns casos óleos essenciais em conjunto com antimicrobianos devido à ação direta deste sobre a estrutura da parede celular bacteriana, além de a maioria dos óleos essenciais possuírem baixa toxicidade em células eucarióticas e uma rápida degradação no meio ambiente, essa sinergia tem o objetivo de diminuir a possível resistência destes antibióticos já pre- existente em linhagens de UPEC (SILVA et al., 2017; SANTOS, 2018).

UPEC é capaz de se locomover e ascender o trato urinário causando uma agressividade maior da doença, isso se deve principalmente a presença de flagelo que é o responsável pela motilidade bacteriana, o flagelo consiste em subunidades repetidas denominadas de flagelina proteica, expressas pelo gene *fliC*, este gene está presente em 80% dos casos das infecções urinárias (SILVA et al. 2017; HEILBERG., 2003)

As fimbrias tem a capacidade de se ligar a receptores do trato urinário facilitando sua colonização no local. As fimbrias mais comuns nas infecções ocasionadas por UPEC são a fimbria do tipo 1 e a fimbria P. As fimbrias do tipo 1, codificada pelo gene *fimH*, medeia a ligação da bactéria à célula epitelial da bexiga, permitindo a permanência desse microrganismo no trato urinário e aumento o risco de uma reinfecção. Vale salientar que este gene está presente em mais de 90% das cepas de *E. coli*. As fimbrias P presentes nas cepas de UPEC promovem bacteriúria rapidamente, induzindo uma resposta inflamatória mais intensa e facilitando a colonização dos rins, além de que a presença dessa fímbria indica uma maior patogenicidade. Em estudos mais recentes, cepas de UPEC expressando esta fimbria foram encontradas na circulação sanguínea indicando a presença de septicemia (SILVA et al., 2017; MARRS, 2005).

Os metabolismos da UPEC são descritos como parte vital do seu mecanismo de sobrevivência pois a mesma necessita de nutrientes e oxigênio adequados para que possa proliferar. Para isto este microrganismo expressa genes que auxiliam na

aquisição de ferro e de nitrogênio para si (OLIVEIRA, 2018; SANTOS, 2018). As cepas de UPEC com o passar do tempo passaram a desenvolver sideróforos como a aerobactina e a enterobactina, moléculas que quelam o ferro com alta afinidade, permitindo uma captação de ferro mais eficiente, também sendo capaz de armazenar o excesso de ferro para que o mesmo não se torne citotóxico. O gene responsável por regularizar a aquisição de ferro se chama gene *iucD*, este é o principal responsável pela síntese do sideroformo denominado aerobactina (ANFORA, 2006; CASSAR, 2013).

O *pili* bacteriano de UPEC é formado pela proteína *papC* localizada na membrana externa de UPEC; entretanto a literatura descreve que a presença deste gene não implica diretamente na patogenicidade de ITUs, sendo que ele pode estar ou não presente em casos mais graves da doença (SANTOS, 2018).

Os patógenos humanos exibem uma série de estratégias para evadir dos mecanismos de ação do sistema imune, dentre as quais podemos citar a produção de proteínas que mimetizam proteínas reguladoras do sistema complemento, a inibição de C3 e C5 convertases ou da formação do complexo de ataque à membrana, bem como a inativação de proteínas do Sistema Complemento pela ação de proteases bacterianas (ABREU; BARBOSA, 2017). Um estudo realizado por Modgil et al. (2020), na Índia, demonstrou a presença de uma serinoprotease em amostras de UPEC. Esta protease foi primeiramente descrita em amostras de EAEC e *S. flexneri* e caracterizada por clivar moléculas do sistema complemento, tal serinoprotease Pic, descrita pela primeira vez por Henderson et al. (1999).

2.4 Serinoproteases

Serinoproteases são enzimas proteolíticas que constituem o tipo catalítico predominante nas peptidases e foram encontrados em todos os três domínios da vida, incluindo bactérias e eucariotos (PAGE; Di CERA, 2008). Essas enzimas receberam essa denominação por possuírem um mecanismo catalítico comum, caracterizado pela existência de um resíduo do aminoácido serina no sítio ativo, essencial para atividade enzimática (KHAN et al., 1999).

Acredita-se que um terço das serinoproteases catalisam a clivagem da ligação peptídica (NAKATSUJI et al., 2016). Eles contêm um resíduo de serina em seu sítio

catalítico (AYALA-LUJAN et al., 2014) capaz de realizar uma variedade de funções fisiológicas e celulares (STROBER; FUSS, 2011). Estas enzimas são produzidas como proteínas precursoras compreendendo pré peptídeo, pró-peptídeo e proteína madura. O pré peptídeo ajuda a exportar a enzima para a região extracelular e o pró-peptídeo mantém a enzima em forma zimogênica (VIEIRA et al., 2018).

Serinoproteases secretadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae* são conhecidas como SPATEs (*serino protease autotransporter of Enterobacteriaceae*) e são responsáveis por diversas funções de virulência. A distribuição de SPATEs é estudada principalmente em *E. coli* diarreiogênica e extraintestinal patogênica (TAPADER et al., 2014) e, apesar de compartilharem características estruturais idênticas, as SPATEs exibem vários mecanismos de patogênese e especificidades de substrato distintos (DUTTA et al., 2002).

SPATEs foram categorizadas em duas classes (Figura 2), as pertencentes à classe I, consideradas citotóxicas para células epiteliais, a exemplo de Pet (toxina codificada pelo plasmídeo), Sat (toxina autotransportadora secretada), SigA, EspP, EspC (proteína C secretada por EPEC) e Vat (toxina autotransportadora vacuolante) (DAUTIN, 2010; DUTTA, 2002; BOISEN et al., 2009, HOSSEINI et al., 2018); e as SPATES de Classe II, consideradas não citotóxicas e compreendem Pic (proteína envolvida na colonização intestinal), SepA (proteína extracelular de *Shigella A*), EatA (autotransportador ETEC A) e Tsh (hemaglutinina sensível à temperatura), que também recebeu o nome de Hbp (hemoglobina protease) (DUTTA et al., 2002; TAPADER et al., 2019).

2.5 Proteína envolvida na colonização (Pic)

Pic é uma proteína de 116 kDa, secretada por *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *S. flexneri* e *C. rodentium* (RAJAKUMAR et al., 1997; HENDERSON et al., 1999; ABREU et al., 2016).

Um importante papel para Pic na patogênese pode estar relacionado à sua atividade mucinase que é evidenciada por sua capacidade de clivar as glicoproteínas CD43, CD45, CD44 e PDGL1 expressas em células hematopoiéticas (Ruiz-Perez e Nataro, 2014). Na patogênese por *E. coli* e *S. flexneri* ocorre o contato com células

da mucosa intestinal. No entanto, a camada de muco que recobre a superfície da mucosa é considerada uma barreira protetora contra infecções entéricas (RAJAKUMAR et al., 1997).

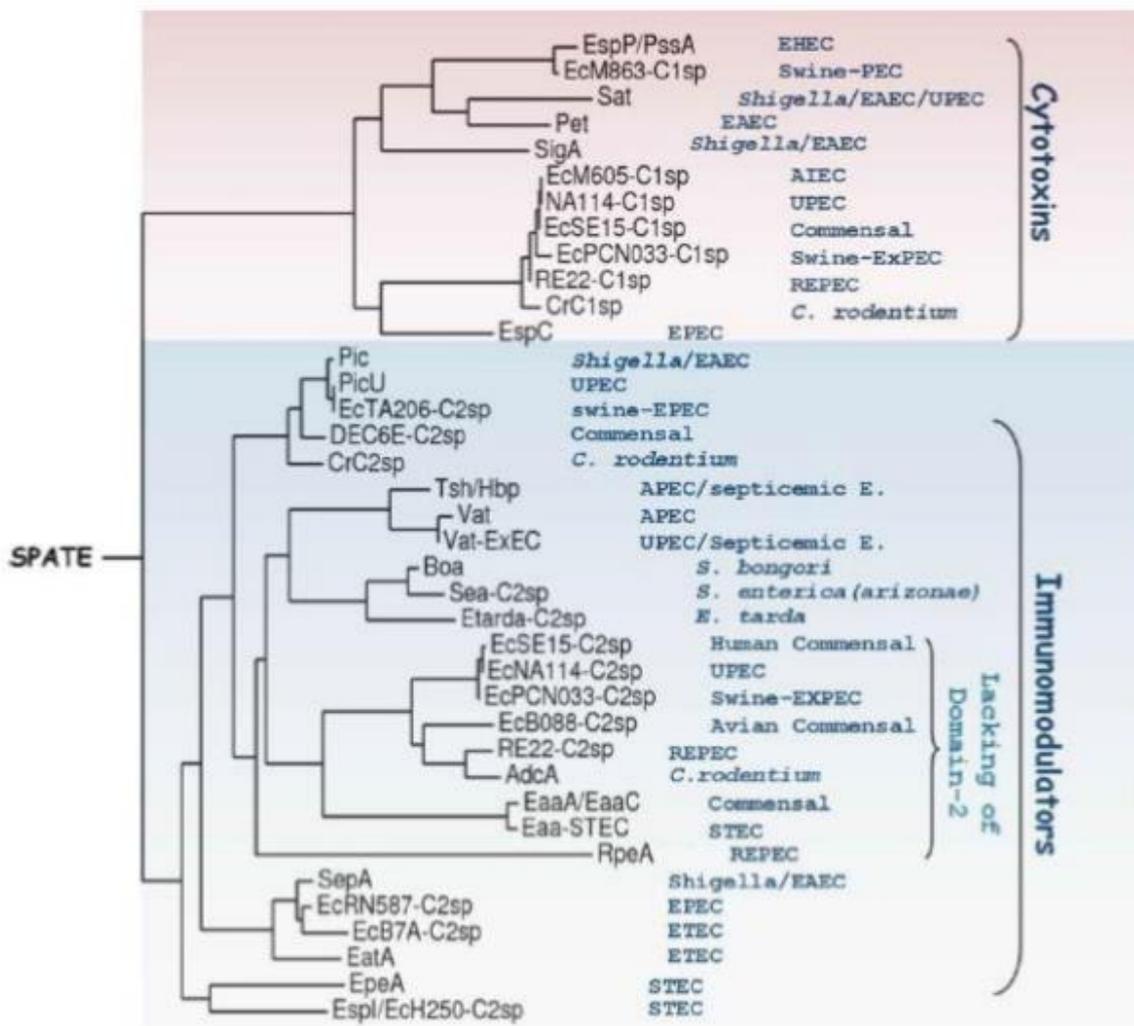


FIGURA 2: Classificação das SPATEs. FONTE: Ruiz-perez e Nataro, 2014.

O papel de Pic na literatura está bem elucidado. Possui um papel importante na hemaglutinação (DUTTA et al., 2002), clivagem de moléculas do sistema complemento (ABREU et al., 2015), resistência a atividade bactericida do soro humano (HENDERSON et al., 1999), além de induzir células caliciformes a produzir muco intestinal (NAVARRO-GARCIA et al., 2010). Pic diminuiu a capacidade de ativação do sistema complemento clivando o componente das três vias sendo ela composta pela via clássica, via das lectinas e via alternativa (ABREU; BARBOSA,

2017) induzindo a sepse letal em animais infectados com *E. coli* produtora desta serinoprotease em até 12 horas após a infecção (DUTRA et al., 2020). Além disso, Pic atua em sinergismo com reguladores do sistema complemento, inibindo assim, proteínas importantes para a ativação do sistema (ABREU et al., 2015). Um estudo relatou a presença de SPATEs, dentre eles *pic*, em subgrupos típicos e atípicos de EAEC (Andrade et al., 2011). Além disso, já foi descrito que anticorpos anti-Pic são produzidos durante a infecção natural, sendo detectados em amostras de soro de crianças com diarreia aguda causada por EAEC (BELLINI et al., 2005).

Dutra e colaboradores (2020) demonstraram que bactérias produtoras de Pic conseguem permanecer vivas no sangue, o que não aconteceu com o grupo bacteriano mutante Δpic . A sobrevivência desta bactéria provavelmente está ligada ao fato de que Pic cliva as moléculas do sistema complemento e esta ação mantém a bactéria viável no sangue. Além disso, os autores mostraram que estas induzem a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6, e IL-12) e anti-inflamatória IL-10, bem como a produção de outros mediadores inflamatórios, a exemplo do óxido nítrico.

Testes *in vitro* e *ex vivo* têm comprovado o alto grau de virulência de Pic incluindo sua atividade mucinolítica, demonstrando que ele ajuda na degradação do muco que reveste o epitélio intestinal (HARRINGTON et al., 2009; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ et al., 2008). Desta forma com a destruição da barreira protetora do epitélio intestinal causa a persistência bacteriana, conseqüentemente migração para outros órgãos como, o trato urinário e alguns deles têm a capacidade de atingir a corrente sanguínea podendo causar bacteremia e sepse. (HERZOG et al., 2014).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Detectar o gene *pic* em *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de pacientes com infecção do trato urinário e realizar a caracterização fenotípica destes isolados.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar o gene *pic* em isolados de UPEC oriundas de pacientes com infecção do trato urinário;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade destes isolados aos antimicrobianos;
- Investigar a capacidade de formação de biofilme;
- Avaliar a grau de virulência dos isolados em modelo alternativo de larvas de *Tenebrio molitor*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Em acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade CEUMA, sob o parecer nº 2.221.431/2017 (Anexo I).

4.2 Coleta das amostras

As amostras de urina, provenientes de pacientes com diagnóstico de infecção urinária juntamente com as fichas técnicas contendo idade e sexo, foram obtidas no período de 09 de setembro a 09 de novembro de 2019 por conveniência pelo Laboratório Cedro que recebe amostras de diversas cidades do estado, dentre as quais: São Luís, Pinheiro, Barreirinhas, Presidente Vargas, Coroatá, Peritoró, Alto Alegre do Maranhão, Presidente Dutra, Imperatriz, dentre outras.

4.3 Identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Foram utilizados os meios de cultura convencionais para semeadura dos espécimes clínicos, tais como, ágar sangue, ágar MacConkey e Caldo Tioglicolato. A identificação dos microrganismos foi realizada através do sistema automatizado MALDI-TOF. Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi empregado o método automatizado Vitek 2 (Biomérieux Marcy L`etoile, França), bem como o método de disco-difusão (Kirby-Bauer), de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019).

4.4 Extração de DNA

As técnicas gerais de biologia molecular utilizadas neste estudo estão descritas em Sambrook et al. (1989) e Ausubel et al. (1995). O DNA bacteriano foi obtido pelo método de fervura. Para isto, uma colônia selecionada a partir de um cultivo prévio em ágar foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 500 µL de água destilada e submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo por 5 minutos.

4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para detectar a presença de *pic* entre os isolados, conforme descrito por Abreu et al. (2013).

Foram utilizados: 1,0 µL de cada um dos iniciadores específicos (*forward* e *reverse*), 0,3 µL de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,0 µL de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 1X (Invitrogen), 2,5 µL de dNTPs (Invitrogen), 1 µL de DNA e água MilliQ estéril para um volume final de 25 µL.

Na PCR foram utilizados iniciadores (F) GGGTATTGTCCGTTCCGAT e (R) ACAACGATACCGTCTCCCG, com o seguinte ciclo de amplificação para detecção do gene *pic*: 94°C por 5 min (desnaturação inicial); 30 ciclos, sendo 94°C para desnaturação por 1 min, 60°C para anelamento por 1 min, 72°C para extensão por 1 min, extensão final a 72°C por 7 min e hold a 4°C infinito.

4.6 Eletroforese em gel de agarose

Após PCR, os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen), utilizando o tampão TBE 0,5X. A concentração do gel variou de 1% a 1,5%, de acordo com o tamanho do fragmento amplificado. Ao gel foram acrescentados 5 µL do corante *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen) para visualização dos fragmentos em luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular foi utilizado 1kb *DNA Ladder* (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada sob corrente constante de 80 V em tampão TBE 0,5X, seguido de visualização no transiluminador de luz ultravioleta.

4.7 Ensaio de Formação do Biofilme Bacteriano

Os ensaios de formação do biofilme foram realizados de acordo com o método descrito por Wakimoto et al. (2004) com modificações, utilizando placas de poliestireno com 96 poços (WAKIMOTO et al., 2004). Os isolados de UPEC foram incubados em caldo LB à 37 °C por um período de 18 horas. Após as 18 horas, 10 µL da cultura foram colocadas em tubos contendo 100 µL de LB e incubadas a 37°C por 2 h e lidas através de um espectrofotômetro até atingir a D.O de 0,1. Os poços foram preenchidos em triplicatas com 200 µL das amostras e incubado por 18 horas

em estufa à 37 °C. Após esse período, o meio foi descartado e lavado com PBS 3x, adicionando logo após a lavagem 200µl de metanol por 15 minutos, após este tempo o metanol foi retirado. Para corar o biofilme, 100 µL de solução aquosa de cristal violeta (CV) à 3% foram adicionados a cada poço e deixados por 20 minutos. A escolha do CV como corante para biofilme foi devido a afinidade do corante com moléculas carregadas negativamente, células e polissacarídeos que compõem a matriz extracelular do biofilme (LI et al., 2003). Em seguida, a solução foi descartada e os poços lavados com água destilada estéril. Então, 200µl de etanol foram adicionados a cada poço e a D.O determinou-se após a leitura de absorbância a 570 nm. Os biofilmes foram quantificados utilizando a média do cristal violeta adsorvido ao poço somado ao cristal violeta solubilizado por etanol. Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes, utilizando como controle positivo a cepa EAEC 042 graças a sua característica de produzir biofilme e como controle negativo a cepa HB101. Foram consideradas como formadoras de biofilme, as cepas de UPEC que formaram biofilme em níveis superiores ou igual ao controle positivo 042.

4.8 Modelo de infecção *in vivo*

4.8.1 Ensaio de sobrevivência com larvas de *Tenebrio molitor*

O teste de sobrevivência de larvas foi realizado segundo a metodologia de Colasso et al (2019) com algumas alterações. As larvas de *T. molitor* com aproximadamente 100 mg foram randomizadas em grupos de 10 indivíduos. Antes da inoculação no corpo das larvas, as cutículas foram limpas com álcool 70%. Depois da antissepsia, com o auxílio de uma Seringa de Hamilton, foi injetada 10 µL de uma suspensão microbiana em salina padronizada na D.O de 0,1, na última falsa pata das larvas. Os grupos de larvas infectadas foram colocadas em placas de Petri e incubados na estufa a 37°C, a viabilidade foi avaliada diariamente ao longo de 10 dias pela ausência de movimento.

4.9 Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos uma vez. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas (Newman Keuls) utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.

5 RESULTADOS

Na primeira etapa deste trabalho o laboratório parceiro recebeu 9.961 amostras de urina de pacientes com ITU em 30 cidades do estado do Maranhão, no período de setembro a novembro de 2019. Destas, 2.292 (23%) foram positivas para algum tipo de microrganismo. Das amostras positivas, 980 (42,75%) foram *E. coli*, das quais 368 foram selecionadas de forma aleatória para a realização da PCR para detecção do gene *pic*.

Um total de 31 isolados (9,2%) foram positivos para o gene *pic*. Contudo, apenas quatro isolados foram positivos somente para este gene. Outros genes que codificam para autotransportadoras foram pesquisados previamente. Estes isolados foram denominados de ITU014, ITU015, ITU032 e ITU040 e foram utilizados para a caracterização fenotípica.

Das 368 amostras, 330 (89,7%) foram de pacientes do gênero feminino e apenas 38 (10,3%) do gênero masculino. Com relação aos isolados de interesse, três foram oriundos do sexo feminino (ITU014, ITU015 e ITU032) e uma do sexo masculino (ITU040).

A idade dos pacientes variou de um ano de idade até oitenta anos sendo a amostra ITU015 aquela que apresentou uma maior capacidade de produzir biofilme e encontrada no paciente mais novo desse estudo com somente um ano de idade (figura 4). As amostra ITU040 estava em um paciente com 80 anos de idade e a amostra ITU014 e ITU015 em pacientes com 26 anos (figura 4).

Ao analisar a sensibilidade da cepa aos antimicrobianos, foi possível observar que as amostras apresentaram resistências principalmente aos antibióticos beta-lactâmicos tais como, ampicilina, meropenem, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam (Tabela 1), além de fármacos da classe dos nitrofuranos, das sulfonamidas e das quinolonas.

O índice MAR (resistência múltipla a antibióticos) é um parâmetro, usado para determinar se o patógeno possui resistência a mais de uma classe de antimicrobiano. Neste estudo obtivemos um índice baixo de MAR (tabela 1), com a maioria das amostras sensíveis aos antibióticos testados. Por outro lado, o isolado ITU014 apresentou resistência apenas ao fármaco meropenem.

Tabela 1: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras ITU014, ITU015, ITU032 e ITU040 obtido pelo método automatizado Vitek 2 e disco-difusão. O teste foi realizado de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Antibióticos	ITU014	ITU015	ITU032	ITU040	%
Amicacina	X	X	X	X	100
Ampicilina	X				25
Amoxicilina/clavulanato	X				25
Ceftriaxone	X	X	X	X	100
Cefepime	X	X	X	X	100
Cefuroxime	X	X	X	X	100
Cefoxitina	X	X	X	X	100
Ceftazidime	X	X	X	X	100
Ciprofloxacina	X	X	X	X	100
Ertapenem	X	X	X	X	100
Gentamicina	X	X	X	X	100
Levofloxacino	X	X		X	75
Meropenem		X	X	X	75
Nitrofurantoína	X		X	X	75
Norfloxacino	X	X	X	X	100
Piperacilina/Tazobactam	X	X	X		75
Sulfametazol/trimetoprima	X	X		X	75

A formação de biofilme é um importante fator de virulência desempenhando um papel importante nas infecções do trato urinário (ITUs), levando a quadro de infecções persistentes e prostatite aguda. Como podemos observar na figura 3, as cepas ITU032 e ITU040 foram fracas produtoras de biofilme, se compararmos com a cepa padrão 042 (protótipo de EAEC, formadora de biofilme), enquanto a cepa ITU 015 produziu mais biofilme que a 042, enquanto a ITU 014 produziu uma quantidade de biofilme moderada.

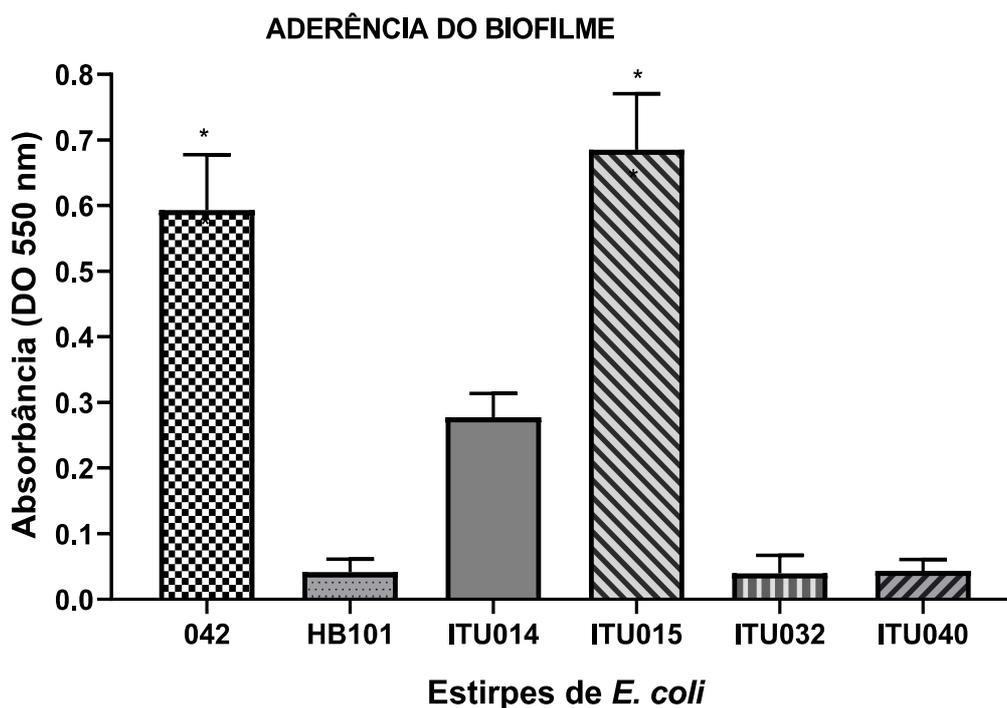


Figura 3 - Formação de biofilme entre os isolados. A avaliação do biofilme se fez a partir da visualização da formação do mesmo em placa de 96 poços, que foi corada com cristal violeta a 0,5% e lida no leitor de ELISA a 550 nm. Amostras com DO < 0,1 foram consideradas negativas para a produção de biofilme e DO > 0,1 foram consideradas positivas. Para o controle positivo foi utilizado uma amostra de *E. coli* EAEC 042 e para o controle negativo *E. coli* HB101. Os testes foram feitos em triplicatas e o resultado apresentado no gráfico é a média de cada amostra.

No teste de sobrevivência de larvas de *T. molitor* foi possível observar que após o 1º dia de infecção a taxa de sobrevivência das larvas começou a cair. No 5º dia a cepa 042 causou 100% de taxa de mortalidade das larvas (figura 4). As demais linhagens testadas apresentaram diferentes resultados, causando uma taxa de mortalidade maior nos animais infectados com as cepas ITU015 e ITU040 (60%). O isolado ITU014 induziu a uma taxa de mortalidade larval alta com 90%, quando comparado com os outros isolados. ITU032 causou mortalidade de 70% das larvas. Os grupos infectados com uma solução salina e a cepa não patogênica foram os que

apresentaram uma mortalidade menor, sendo estes respectivamente o PBS (80%) e HB101 (70%).

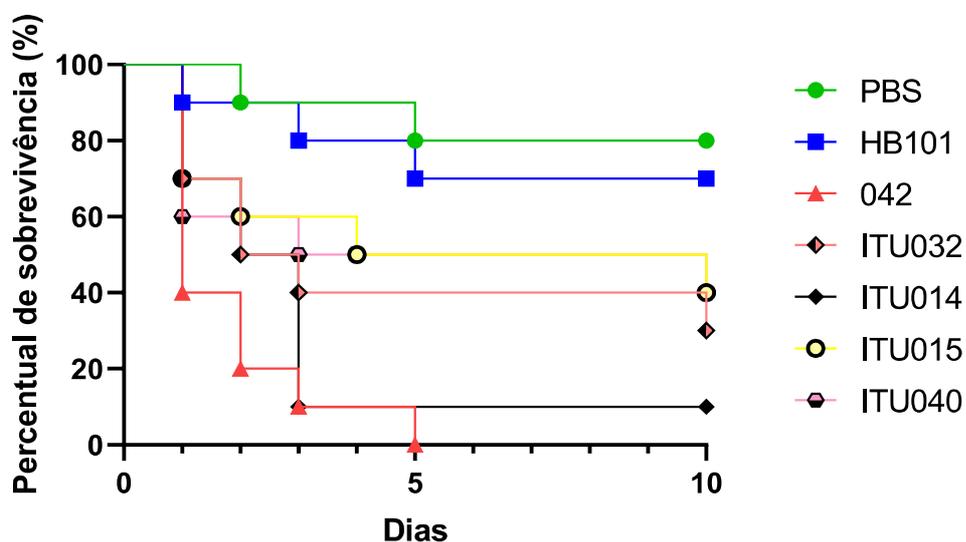


Figura 4: Ensaio de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor*. O ensaio de sobrevivência foi realizado sobre um modelo *in vivo* em larvas *T. molitor* (n= 10/grupo). Inicialmente foi preparado inoculo bacteriano na O.D de 0,1 lida no leitor de ELISA a 550 nm. Foram injetadas 10 μ L desta suspensão microbiana, na última falsa pata das larvas de *T. molitor*, e as larvas acompanhadas ao longo de 1^o dias. Para o controle positivo foi utilizado uma amostra de *E. coli* EAEC 042 e para o controle negativo *E. coli* HB101.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisadas amostras de UPEC isoladas de casos de ITU em hospitais de São Luís - MA. Após avaliação do perfil de susceptibilidade, foi realizada a PCR para a detecção do gene *pic*, sendo, portanto, o primeiro estudo na região Nordeste do Brasil a pesquisar este gene em amostras de ITU. As amostras que continham o gene corresponderam a 9,23% dentre as analisadas. Resultado estatisticamente igual o estudo realizado na Índia por Modgil et al. (2020) que analisou 163 isolados de *E. coli* de casos de infecção do trato urinário e observou a presença de *pic* em 9,2% das amostras de UPEC.

Os dados que relatam a origem das amostras comprovam o que a literatura já relata, que as ITUs são mais frequentes em pacientes do sexo feminino e idosos com mais de 60 anos de idade do que em jovens novos (MASSON et al., 2020; SROUGI, 2005).

Ao analisar o perfil de sensibilidades das amostras de UPEC deste estudo, foi possível observar que os isolados apresentaram uma baixa resistência aos antimicrobianos testados. Basicamente, uma resistência a antibióticos da classe dos beta-lactâmicos, a exemplo das ampicilinas. Por outro lado, De Souza et al. (2019) ao avaliarem isolados de UPEC de âmbito hospitalar e comunitário, mostraram que os isolados de origem hospitalar apresentaram um índice de MAR de 55%.

A resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos aumentou significativamente nos últimos anos, Graravi et al. (2021) já demonstraram que amostras de UPEC tendem a ser amplamente resistente as penicilinas, sendo que os autores encontraram 80,9% de amostras resistentes a ampicilina e seus derivados. Esta resistência pode estar correlacionada ao fato de que bactérias da família *Enterobacteriaceae* produzem enzimas denominadas de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), responsável por hidrolisar o anel beta-lactâmico presente no fármaco, fazendo que ocorra assim a perda da capacidade de inibição da parede celular bacteriana (OLIVEIRA; LACERDA, 2017; SOARES; CARNEIRO, 2020).

Os antimicrobianos são as classes medicamentosa utilizadas em quadros de ITUS, porém a demora do diagnostico leva ao uso empírico do tratamento, levando assim a seleção de cepas cada vez mais resistentes em infecções urinarias

relacionadas a UTIs, sendo necessário o conhecimento prévio de qual patógeno estamos lidando na doença para não ocorrer o risco de levar o paciente a óbito e assim surgir bactérias resistentes a todas as classes de antimicrobianos (CUNHA et al, 2016; VENTOLA., 2015).

Neste trabalho também foi avaliado a capacidade dos isolados formarem biofilme. Essa capacidade normalmente está associada à presença de fatores de virulência, entretanto existem bactérias que não possuem nenhum gene característico para formação de biofilme, mas mesmo assim formam um biofilme considerado fraco (POMPILIO et al., 2018; EBERLY et al., 2017).

Nossos dados demonstram que a habilidade das cepas de *E. coli* em formar biofilme é altamente variável, não havendo uma tendência específica em relação à patogenicidade. Diedrich (2017) relatou que a capacidade de amostras de UPEC produzirem biofilme não depende dos seus grupos filogenéticos, não encontrando, assim, uma relação direta da formação de biofilme com a origem da amostra ou a patogenicidade do isolado bacteriano, levando à conclusão que amostras mais patogênicas não são necessariamente produtoras de biofilme. Diversos fatores já apontaram que a capacidade de uma bactéria produzir biofilme podem variar bastante, podendo estar relacionada a mudanças de temperatura, pH, e outros nutrientes presentes no meio em que ocorra o crescimento bacteriano (RODRIGUES et al., 2010; OOSTERIK et al., 2014; MILANOV et al., 2015; FLEMMING et al., 2016).

Modgil et al. (2020) analisaram 130 amostras de UPEC isoladas de um quadro de infecção, das quais 94 (72,3%) produziram algum tipo de biofilme, sendo 21,2% sendo considerado um biofilme do tipo fraco.

Mesmo o estudo do biofilme, não sendo ligado diretamente com o grau de patogenicidade de UPEC, ele ainda constitui um fator de risco, principalmente se levarmos em conta que este patógeno tem grande participação em infecções de âmbito hospitalar, relatando casos que bactérias encontradas neste ambiente possuem uma maior resistência aos antibióticos, levando a dificuldade no tratamento de infecções urinárias e um tempo mais prolongado que pode levar a uma infecção secundária pelo ambiente (HANNA et al., 2003; COSTERTON 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; DUNNE, 2002).

O método de microplaca utilizada neste estudo tem a vantagem de se poder investigar um número maior de amostras que outros métodos, além de ser uma metodologia considerada barata e eficaz, utilizada por outros grupos de pesquisa quando se deseja investigar a produção de biofilmes de diversos patógenos ao mesmo tempo, sendo possível realizar o teste em triplicata com uma só placa (STEPANOVIĆ et al., 2007; COENYE; NELIS, 2010).

Por fim, o grau de virulência dos isolados foi avaliado em modelo *in vivo* utilizando de larvas de *T. molitor*. Modelos de infecção usando insetos têm se tornado bastante populares, por serem mais rápidos e econômicos que os modelos murino e por apresentarem resultados mais relevantes que os ensaios baseados em células (SILVA et al., 2017). Nos ensaios utilizando animais invertebrados é possível avaliar o percentual de sobrevivência larval frente a uma bactéria patogênica, quanto a toxicidade e atividade antivirulência de vários compostos de origem natural. Colasso et al. (2019), por exemplo, mostraram que o produto derivado do leite de *Euphorbia tirucalli* (LET) diminui a produção de estafilocoxina e um carotenoide da membrana de *S. aureus* que confere proteção contra espécies reativas de oxigênio, impedindo que esta bactéria causasse morte em 100% dos grupos de *T. molitor*. Pereira et al. (2021) também mostraram a ação do cinamaldeído no aumento da sobrevivência de larvas infectadas com *E. coli* patogênica 042.

Neste trabalho foi possível mostrar que as larvas que foram inoculadas com as amostras que continham o gene *pic* foram mais letais que os controles negativos PBS e HB101, a morte total dos grupos não aconteceu provavelmente devido ao fato de os insetos possuírem um sistema imune bem desenvolvidos, consistindo de peptídeos antimicrobianos (AMPS) que atacam patógenos invasores e garantem uma maior capacidade de sobrevivência frente a diversos patógenos (JIANG, 2006; WANG et al., 2019).

Edosa et al. (2020) infectaram larvas de *T. molitor* com uma *E. coli* K-12 obtendo uma sobrevivência de 68,5% das larvas ao total dos 10 dias de seu experimento, ressaltando que as cepas K-12 são desprovidas dos genes de virulência conhecidas de *E. coli*, sendo considerada uma cepa segura e não patogênica (MÜHLENDORFER; HACKER 1994). Entretanto quando essa mesma cepa

é infectada em larvas imunocomprometidas a taxa de sobrevivência cai drasticamente, obtendo uma taxa de apenas 30% de sobrevivência larval (KESHAVARZ et al., 2020).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença do gene *pic* nas amostras de UPEC indica que as bactérias possivelmente continuam repassando seus genes de virulência através de transferência horizontal entre elas, haja vista que *pic* é amplamente encontrada em cepas de EAEC e pouco relacionada a infecções urinárias, podendo a expressão deste estar ou não relacionada a quadros mais graves de uma infecção urinária.

A identificação dos fatores de virulência presentes em UPEC facilitam o conhecimento dos métodos de aderência locomoção e invasão da bactéria, permitindo usá-las na investigação de seus tratamentos. Todas as cepas deste estudo apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos sendo essa resistência algo que acontece naturalmente entre membros da família *Enterobacteriaceae*. Entretanto, o uso excessivo e incorreto de antimicrobianos pela população cria cada vez mais bactérias resistentes ao tratamento pré-existente como podemos ver no caso de ITU015 e ITU040 que apresentaram resistência também aos antimicrobianos da classe dos nitrofuranos e sulfonamidas respectivamente.

A disseminação de *E. coli* resistente é um grande desafio para os microbiologistas, especialmente nos países em desenvolvimento, pois nestes países a falta de higiene e acesso precário aos cuidados de saúde e baixo investimento financeiro nos sistemas de saúde favorecem a taxa de mortalidade.

Neste estudo foi observado que os isolados ITU032 e ITU040 produziram um biofilme considerado fraco se comparamos com o controle positivo EAEC 042, indicando que elas podem ser menos patogênicas que as amostras ITU014 e ITU015 que produziram uma quantidade maior de biofilme quando comparado com o controle, EAEC 042.

O teste de sobrevivência de larvas de *T. molitor* indicou que a capacidade do patógeno produzir biofilme não foi um fator determinante na taxa de letalidade das larvas, uma vez que o isolado ITU014 foi o que causou uma maior morte das larvas, com taxa de sobrevivência de apenas 10%, enquanto que o isolado ITU015 que apresentou uma quantidade maior de biofilme causou óbito de 60% das larvas.

8 CONCLUSÃO

- Este é o primeiro trabalho da região Norte-Nordeste do Brasil a detectar o gene *pic* em amostras UPEC;
- Todas as amostras apresentaram resistência a pelo menos uma classe de antimicrobiano, inclusive com um dos isolados, ITU014, apresentando resistência ao meropenem;
- A capacidade de formação de produção de biofilme variou entre as amostras estudadas. Contudo, não foi possível observar uma relação com a letalidade das larvas de *Tenebrio molitor*, mesmo entre os isolados com elevada produção de biofilme;
- Todos os isolados causaram elevada letalidade para as larvas de *T. molitor*.

REFERÊNCIAS

ABREU AG, ABE CM, NUNES KO, MORAES CT, CHAVEZ-DUENAS L, NAVARRO-GARCIA F, BARBOSA AS, PIAZZA RM, ELIAS WP. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes. Int.* 2016; 7:115-125.

ABREU AG, FRAGA TR, MARTINEZ APG, KONDO MY, JULIAN MA, JULIANO L, NAVARRO-GARCIA F, ISAAC L, BARBOSA AS, ELIAS WP. The serine protease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. *J. Infect. Dis* 2015; 212, p. 106-115.

AKRAM SM, KHAN AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2007; 6, 4.

ALDUNATE M, SRBINOVSKI D, HEARPS AC, LATHAM CF, RAMSLAND PA, GUGASYAN R, CONE RA, TACHEDJIAN G. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Frontiers in physiology* 2015; 6, 164.

ANFORA AT, WELCH RA. DsdX is the second D-serine transporter in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolate. *Journal of Bacteriology* 2006; v. 188, p. 6622-6628

AYALA-LUJAN JL, VIJAYAKUMAR V, GONG M, SMITH R, SANTIAGO AE, RUIZ-PEREZ F. Broad spectrum activity of a lectin-like bacterial serine protease family on human leukocytes. *PLoS One* 2014; 24:e107920.

BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS JC, TURCK M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 1966; Volume 45, Issue 4_ts, Pages 493–496.

BELLINI ME, ELIAS PW, GOMES ATT, TANAKA LT, TADDEI RC, HUERTA R, NAVARRO-GARCIA F, MARTINEZ BM. Antibody response against plasmid-encoded toxin (Pet) and the protein involved in intestinal colonization (Pic) in children with diarrhea produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Immunology & Medical Microbiology*, 2005; V.43, 259–264.

BERALDO-MASSOLI MC, NARDI CPP, MAKINO LC, SCHOCKEN-ITURRINO RP. Prevalência de infecções urinárias em pacientes atendidos pelo sistema único de saúde e sua suscetibilidade aos antimicrobianos. *Medicina Ribeirão Preto* 2012; 45(3):318-321.

BHULLAR K, ZAREPOUR M, YU H, YANG H, CROXEN M, STAHL M, FINLAY BB, TURVEY SE, VALLANCE BA. The Serine Protease Autotransporter Pic Modulates *Citrobacter rodentium* Pathogenesis and Its Innate Recognition by the Host. *Infect Immun* 2015; 83(7):2636-50.

BIEN J, SOKOLOVA O, BOZKO P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol* 2012; :681473

BOISEN N, RUIZ-PEREZ F, SCHEUTZ F, KROGFELT KA, NATARO JP. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80:294–301.

BRAIOS A, TURATTI TF, MEREDIJA LCS, CAMPOS TRS, DENADAI FH. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. *J. Bras. Patol. Med* 2009; v. 45, n. 6, p. 449-456.

BRESOLIN NL. Infecção do Trato Urinário. Departamento Científico de Nefrologia SBP 2016; Rio de Janeiro, v. 1, [sn], p 1-8.

CAR J. Urinary tract infections in women: diagnosis and management in primary care. *BMJ* 2006; 332 :94.

CASSAR J, SKAAR E. Iron in Infection and Immunity. *Cell Host Microbe* 2013; v. 13, p. 509- 519.

CHUNG A, ARIANAYAGAM M, RASHID P. Bacterial cystitis in women. *Aust. Fam. Physician* 2010; v. 39, p. 295-298.

CLERMONT O, GORDON D, DENAMUR E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology* 2015; v.161, p.980 – 988.

COENYE T, NELIS HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 2010; v. 83, n. 2, p. 89–105.

COLASSO AHM, BARROS TF, FIGUEIREDO IFS, CARVALHO ARJ, FERNANDES ES, UCHOA MRB, DA SILVA LCN. The latex of *Euphorbia tirucalli* inhibits staphyloxanthin production and protects *Tenebrio molitor* larvae against *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Prod. Res* 2019.

CONNELL H, AGACE W, KLEMM P, SCHEMBRI M, MARILD S, SVANBORG C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; v. 93, p. 9827–9832.

COSTA LC, BELÉM LF, SILVA FPM, PEREIRA HS, JÚNIOR EDS, LEITE TR, PEREIRA GJS. Infecções Urinárias Em Pacientes Ambulatoriais: Prevalência e Perfil De Resistência Aos Antimicrobianos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 2010; 42(3), 175-180.

COSTERTON JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, 1999.

CROXEN MA, LAW RJ, SCHOLZ R, KEENEY KM, WLODARSKA M, FINLAY BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26:822– 880.

CUNHA MA, ASSUNÇÃO GLM, MEDEIROS IM, FREITAS MR. Antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in a north eastern brazilian capital. *Rev Inst Med Trop* 2016; 58:1–4. doi:10.1590/S1678-9946201658002

DAUTIN N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATES): biogenesis and function. *Toxins*. 2010; v. 2, P. 1179-1206.

DE SOUZA GM, NETO ERDS, DA SILVA AM, IACIA MVMS, RODRIGUES MVP, CATANELI PEREIRA V, WINKELSTROTTER LK. Comparative Study Of Genetic Diversity, Virulence Genotype, Biofilm Formation And Antimicrobial Resistance Of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolated From Nosocomial And Community Acquired Urinary Tract Infections. *Infect Drug Resist* 2019; 12:3595-3606.

DIEDRICH LN. Avaliação da relação dos grupos filogenéticos com a formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli* uropatogênica (upec). Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, 2017.

DODSON G, WLODAWER A. Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences* 1998; Volume 23, Issue 9, Pages 347-352.

DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microbiol.*, Ver 2002; v. 15(2), p.167–193.

DUTTA PR, CAPPELLO R, NAVARRO-GARCÍA F, JAMES P, Nataro JP. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infection and Immunity* Dec 2002; 70 (12) 7105-7113.

DUTRA IL, ARAÚJO LG, ASSUNÇÃO RG, LIMA YA, NASCIMENTO JR, VALE AAM, ALVES PCS, TROVÃO LO, SANTOS ACM, SILVA RM, SILVA LA, MACIEL MCG, DE SOUSA EM, ELIAS WP, NASCIMENTO FRF, ABREU AG. Pic-Producing *Escherichia coli* Induces High Production of Proinflammatory Mediators by the Host Leading to Death by Sepsis. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(6):2068

EBERLY AR, FLOYD KA, BEEBOUT CJ, COLLING SJ, FITZGERALD MJ, STRATTONCW, SCHMITZ JE, HADJIFRANGISKOU M. Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* is favored under oxygen conditions that mimic the bladder environment. *Int J Mol Sci* 2017; 18:1–12.

EDOSA TT, JO YH, KESHAVARZ M, BAE YM, KIM DH, LEE YS, HAN YS. *TmSpz6* Is Essential for Regulating the Immune Response to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Infection in *Tenebrio molitor*. *Insects* 2020; 11(2):105.

FABBRI RMA, PIRES SL. Infecção do Trato Urinário. Tratado de geriatria e gerontologia. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016; v. 1, CAP 67 p. 1002.

FELD LG, MATTOO TK. Urinary tract infections and vesicoureteral reflux in infants and children. *Pediatr Rev.* 2010; 31:451-463.

FERNANDO MMPSC, LUKE WANV, MITHTHINDA JKNDR, WICKRAMASINGHE RDSS, SEBASTIAMPILLAI BS, GUNATHILAKE MPML, SILVA FHDS, PREMARATNA R. Extended spectrum beta lactamase producing organisms causing urinary tract infections in Sri Lanka and their antibiotic susceptibility pattern –a hospital based cross sectional study. *BMC Infect Dis* 2017; 17:1–10.

FERREIRA GS. Disbiose intestinal: aplicabilidade dos prebióticos e dos probióticos na recuperação e manutenção da microbiota intestinal. Monografia (Ciências Farmacêuticas) - Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas, 2014.

FIHN SD. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. *N. Engl. J. Med* 2003; 349: 259–266.

FLEMMING HC, WINGENDER J, SZEWZYK U, STEINBERG P, RICE SA, KJELLEBERG S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 2016; v. 14, n. 9, p. 563–575.

FLORES-MIRELES AL, WALKER JN, CAPARON M, HULTGREN SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology* 2015;13(5):269-284.

GOMES TAT, ELIAS WP, SCALETSKY ICA, GUTH BEC, RODRIGUES JF, PIAZZA RMF, FERREIRA LCS, MARTINEZ MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2016; 47:3–30.

GOMES CA, MAHLKE JD. Infecção Urinária em Crianças: Perfil das Bactérias e Suscetibilidade aos Antimicrobianos Usados na Urocultura Realizadas no Laboratório Clínico do Hospital Municipal Infantil Santo Antônio em Boa Vista Roraima. *Caderno de Ciências Biológicas e da Saúde* 2013 n.02.

GONÇALVES L, ANSELMO M, BARROS FM, ROCHA E, MAIO J. Infecção Urinária na Criança Casuística de 5 Anos de Internamento. *Acta Pediatr* 2001; 6 (32), 351-356.

HANNA A, BERG M, STOUT V, RAZATOS A. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2003; v. 69, p. 4474– 4481.

HARRINGTON SM, SHEIKH J, HENDERSON IR, RUIZ-PEREZ F, COHEN PS, NATARO JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect. Immun* 2009; Int. 77, p. 2465-2473.

HENDERSON IR, CZECHULIN J, ESLAVA C, NORIEGA F, NATARO JP. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun* 1999. V 67, pag 5587–5596.

HERZOG K, ENGELER DUSEL J, HUGENTOBLE M, BEUTIN L, SÄGESSER G, STEPHAN R, HÄCHLER H, NÜESCH-INDERBINEN M. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. *Infection* 2014; 42:441-4.

HOSSEINI NA, SAMAREH SM, LASHKARI M, RAYARI MA, HASHEMIZADEH Z, SEYEDI, MARGHAKI F, MOHSENI F. Distribution of genes encoding virulence factors and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAES) isolates in Iran from patients with diarrhea. ***Journal of medical microbiology*** 2018; 67 (9), 1334.

KHAN AR, KHAZANOVICH-BERNSTEIN N, BERGMANN EM, JAMES MN. Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 1999; Sep 28;96(20):10968-75

KESHAVARZ M, JO YH, EDOSA TT, HAN YS. Tenebrio Molitor PGRP-LE Plays a Critical Role in Gut Antimicrobial Peptide Production in Response to Escherichia Coli. *Front Physiol* 2020; 11:320.

JENSEN BH, OLSEN KEP, STRUVE C, KROGFELT KA, PETERSEN AM. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2014; 27, 614–630, 10.1128/CMR.00112-13.

JIANG YY. A review of researches on agglutinins of Lepidoptera insect. *Entomol. J. East China* 2006; 15, 25–29.

LEITE L, GULLÓN B, ROCHA J, KÜCKELHAUS S. Papel da microbiota na manutenção da fisiologia gastrointestinal: uma revisão da literatura. *Boletim Informativo Geum* 2014; v. 5, n. 2, p. 54-61.

MAINIL J. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2013; V152.

MALINOVSKI E. Most Frequent Bacteria In Urinary Tract Infections. *Revista Saúde e Meio Ambiente* 2021; v. 12 n. 1.

MARKS FO, OLIVEIRA TMS, FERREIRA G, DALLABRIDA MM, BISEWSKI CG, SOUZA PA. Urinary tract infection: etiology, sensitivity patterns and antimicrobial resistance at a pediatric hospital. *Research, Society and Development* 2020; v. 9, n. 8, p. e677985807, x.

MARRS CF, ZHANG L, FOXMAN B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 252: 183-190.

MASSON P, MATHESON S, WEBSTER AC, CRAIGER JC. Metaanalyses in prevention and treatment of urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23(5):355- 85.

MASSON LC, MARTINS LV, GOMES MC, CARDOSO AM. Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: relação entre a urocultura e o EAS. *RBAC* 2020; 52(1):77-81

MELO LS, ERCOLE FF, OLIVEIRA DU, PINTO TS, VICTORIANO MA, ALCOFORADO CLGC. Infecção do trato urinário: uma coorte de idosos com incontinência urinária. *Rev. Brasileira de Enfermagem* 2017; Brasília, v.70, n. 4, p. 838-844.

MEUSKENS I, SARAGLIADIS A, LEO JC, LINKE D. Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. *Front Microbiol.* 2019; 10:1163.

MIRANDA SIR, CUNHA JN. Infecção Urinária Pediátrica: um estudo retrospectivo de 5 anos no Hospital Garcia de Orta. Monografia. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa; 2016, Lisboa, Portugal.

MOBLEY HLT. Measuring *Escherichia coli* gene expression during human urinary tract infections. *Pathogens*, 2016; 5(1):7.

MOTA EC, OLIVEIRA AC. Infecção do trato urinário associada a cateter vesical: por que não controlamos esse evento adverso?. *Rev. esc. Enferm* 2019; USP, São Paulo, v. 53, e03452.

MOTA ML. Patogenia da infecção urinária. 2011. 18p. Dissertação (Trabalho de conclusão de curso) - Residência Médica do Hospital do Servidor Público Municipal, São Paulo, 2011.

MILANOV DS, PRUNIC BZ, VELHNER MJ, PAJIĆ MLJ, CABARKAPA IS. RDAR morphotype: A resting stage of some *Enterobacteriaceae*. *Food and Feed Research* 2015; v. 42, n. 1, p. 43–50.

MODGIL V, KAUR H, MOHAN B, TANEJA N. Molecular, phylogenetic and antibiotic resistance analysis of enteroaggregative *Escherichia coli*/uropathogenic *Escherichia coli* hybrid genotypes causing urinary tract infections. *Indian J Med Microbiol* 2020; 38:421-9.

MUHLENDORFER I, HACKER J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb. Pathog* 1994; 16:171–181.

MUNERA D, RITCHIE JM, HATZIOS SK, BRONSON R, FANG G, SCHADT EE, DAVIS BM, WALDOR MK. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. *Nat. Commun* 2014; Int. 5:3080.

NAKATSUJI E, CHEN TH, AIMEE M, CHUN KA, NARALA S., GEHA RS., HATA TR, GALLO RL. *Staphylococcus aureus* Exploits Epidermal Barrier Defects in Atopic Dermatitis to Trigger Cytokine Expression. *Journal of Investigative Dermatology* 2016; Volume 136, Issue 11, Pages 2192-2200, ISSN 0022-202X.

NAVARRO-GARCIA F, GUTIERREZ-JIMENEZ J, GARCIA-TOVAR C, CASTRO LA, SALAZAR-GONZALEZ H, CORDOVA V. Pic, an Autotransporter Protein Secreted by Different Pathogens in the *Enterobacteriaceae* Family, Is a Potent Mucus Secretagogue. *Infection and Immunity* 2010; Vol. 78, No. 10.

NETO ROP, PUGAS AA, LIRA LM, MUNHOZ KS, LIMA JB, ROBERTO KGCM, LINO MSB, FIGUEIREDO IG, NASCIMENTO EP. Pielonefrite Aguda Em Crianças A Partir De Exames Complementares. *Colloquium Vitae* 2019; 11(2): 28-36.

OLIVEIRA TG CX, LACERDA LHG. Perfil De Resistência Dos Microrganismos Mais Prevalentes Em Uroculturas No Laboratório De Análises Clínicas Laboranálise Em Sete Lagoas, Minas Gerais. Revista Brasileira de Ciências da Vida., 2017. v. 5 n. 1.

OLIVEIRA ALD, SOARES MM, SANTOS TCD, SANTOS A. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. Revista Uningá, Maringá 2018; v. 20, n. 3, p. 65-71.

OOSTERIK L H, TUNTUFYE HN, BUTAYE P, GODDEERIS BM. Effect of serogroup, surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*. The Veterinary Journal; 2014. v. 202, n. 3, p. 561–565.

PAGE MJ, Di CERA E. Evolution of peptidase diversity. J. Biol. Chem 2008; 283:30010-14.

PAIXÃO LA, CASTRO FFDS. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. Universitas: Ciências da Saúde 2016; Brasília, v. 14, n. 1, p. 85-96.

PARHAM NJ, SRINIVASAN U, DESVAUX M, FOXMAN B, MARRS CF, HENDERSON IR. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 2004; 230, 73–83.

PATZI-VARGAS S, ZAIDI MB, PEREZ-MARTINEZ I, LEON-CEN M, MICHEL-AYALA A, CHAUSSABEL D, ESTRADA-GARCIA T. Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. PLoS Negl Tropical Diseases 2015; 9:e0003510; PMID:25738580;

PEREIRA CSR, CALHAU P. *Escherichia Coli* e Infecção Urinária Recorrente em Pediatria. Faculdade de medicina de Lisboa 2016; Lisboa, [sv], n. 12705, p. 1-19.

PEREIRA WA, PEREIRA CDS, ASSUNÇÃO RG, DA SILVA ISC, REGO FS, ALVES LSR, SANTOS JS, NOGUEIRA FJR, ZAGMIGNAN A, THOMSEN TT, LØBNER-OLESEN A, KROGFELT KA, DA SILVA LCN, ABREU AG. New Insights into the Antimicrobial Action of Cinnamaldehyde towards *Escherichia coli* and Its Effects on Intestinal Colonization of Mice. Biomolecules 2021; 11, 302.

POMPILIO A, CROCETTA V, SAVINI V, PETRELLI D, DI NICOLA M, BUCCO S, AMOROSO L, BONOMINI M, DI BONAVENTURA G. Phylogenetic relationships,

biofilm formation, motility, antibiotic resistance and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* strains from women with community-onset primitive acute pyelonephritis. *PLoS ONE* 2018; 13:1–26.

RAJAKUMAR K, SASAKAWA C, ADLER B. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the Immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect. Immun* 1997. Int. 65:4606-14.

RANGEL M, TRESSA Y, ZAGO SS. Infecção Urinária Do Diagnóstico Ao Tratamento. *Colloquium Vitae* 2013; 1984-6436, 5(1), 59–67.

RUIZ-PEREZ F, NATARO JP. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell. Mol. Life Sci* 2014; v.71, p. 745-770.

RUIZ-PEREZ F, WAHID R, FAHERTY CS, KOLAPPASWAMY K, RODRIGUEZ L, SANTIAGO A, MURPHY E, CROSS A, SZTEIN MB, NATARO JP. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2011; 108:12881-6.

RODRIGUES LB, SANTOS LR, TAGLIARI VZ, RIZZO NN, TRENHAGO G, OLIVEIRA AP, GOETZ F, NASCIMENTO VP. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; v. 41, n. 4, p. 1082–1085.

SHAIKH S, FATIMA J, SHAKIL S, RIZVI SM, KAMAL MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* 2015; 22:90–101.

STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, HOLA V, DI BONAVENTURA G, DJUKIĆ S, CIRKOVIĆ I, RUZICKA F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 2007, v. 115, n. 8, p. 891–899.

SANTOS TG. Patotipagem, tipagem filogenética, determinação de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* uropatogênica. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2018.

SAUVONNET N, VIGNON G, PUGSLEY AP, FORMAÇÃO DE GOUNON P. Pilus e secreção de proteínas pela mesma maquinaria em *Escherichia coli*. *Jornal Embo.* 2000; 19 (10): 2221–2228.

SCHENKEL DF, DALLE J, ANTONELLO VS. Prevalência de uropatógenos e sensibilidade antimicrobiana em uroculturas de gestantes do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2014; v. 36, n. 3, p. 102-106.

SMITH SB, RAVEL J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol* 2017; 595:451–63.

SILVA KER, ALVES LDS, SOARES MFR, PASSOS RCS, FARIA AR, ROLIM NETO PJ. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Rev Ciênc Farm Básica Apli* 2009; v. 30, n. 2, p. 129-135.

SILVA KL, CECHINEL FV. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. *Quimica Nova* 2002, v. 25, p. 449-454.

SILVA LN, DA HORA GCA, SOARES TA, BOJER MS, INGME H, MACEDO AF, TRENTIN DS. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. *Sci Rep* 2017, v. 7, p. 2823.

SROUGI M. Infecções do trato urinário. *Rev Med (São Paulo)* 2005.;84(3-4):102-12.

STROBER W, FUSS IJ. Citocinas pró-inflamatórias na patogênese de doenças inflamatórias intestinais. *Gastroenterologia.* 2011; 140: 1756–67.

TAPADER R, CHATTERJEE S, SINGH AK, DAYMA P, HALDAR S, PAL A, BASU S. The high prevalence of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) in *Escherichia coli* causing neonatal septicemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33:2015-24.

TAPADER R, BASU S, PAL A. Secreted proteases: a new insight in the pathogenesis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 2019.

ULETT GC, TOTSIKA M, SCHAAL K, CAREY AJ, SWEET MJ, SCHEMBRI MA. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current Opinion in Microbiology* 2013; 16:100–107.

WANG X, ZHANG Y, ZHANG R, ZHANG J. The diversity of pattern recognition receptors (PRRs) involved with insect defence against pathogens. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2019

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2016.

VENTOLA CV. The antibiotic resistance crisis part 1: causes and threats. *P&T.* 2015; 40:277–283.

VIEIRA PCG. Sat (Secreted autotransporter toxin): ação citotóxica da toxina bacteriana em diferentes linhagens celulares e na infecção in vitro por uma cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) sorotipo O125ab. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

ANEXOS

ANEXO I
(Parecer do CEP)



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM HOSPITAIS PÚBLICOS E PRIVADOS DE SÃO LUÍS, MA.

Pesquisador: AFONSO GOMES ABREU JUNIOR

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68915816.2.0000.5084

Instituição Proponente: centro universitario do maranhão-uniceuma

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.221.431

ANEXO II

(PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A2 DURANTE O MESTRADO)



International Immunopharmacology

Volume 100, November 2021, 108094



Immunomodulatory and anti-infective effects of *Cratylia mollis* lectin (Cramoll) in a model of wound infection induced by *Staphylococcus aureus*

Mariela Andrea Medeiros Suarez Carneiro ^a, Lucas dos Santos Silva ^a, Roseana Muniz Diniz ^a, Warlison Felipe da Silva Saminez ^a, Patrícia Vieira de Oliveira ^a, Juliana Silva Pereira Mendonça ^a, Arthur Henrique Mendes Colosso ^a, Izadora Souza Soeiro Silva ^a, Jannyson José Braz Jandú ^b, Joicy Cortez de Sá ^a, Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo ^a, Maria Tereza dos Santos Correia ^b, Luís Cláudio Nascimento da Silva ^a ✉