

CARLOS EDUARDO REU

**INCIDÊNCIA DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÃO URINÁRIA  
EM PACIENTES ATENDIDOS PELAS UNIDADES DE SAÚDE DO  
MUNICÍPIO DE CURITIBA E ANÁLISE GENÉTICA DE *Escherichia coli*  
UROPATOGÊNICA**

CURITIBA  
2013

CARLOS EDUARDO REU

**INCIDÊNCIA DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÃO URINÁRIA  
EM PACIENTES ATENDIDOS PELAS UNIDADES DE SAÚDE DO  
MUNICÍPIO DE CURITIBA E ANÁLISE GENÉTICA DE *Escherichia coli*  
UROPATOGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA  
2013

Reu, Carlos Eduardo

Incidência de bactérias causadoras de infecção urinária em pacientes atendidos pelas unidades de saúde do município de Curitiba e análise genética de *Escherichia coli* Uropatogênica / Carlos Eduardo Reu . Curitiba, 2013.

75 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth

Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Dissertação (mestrado) . Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. *Escherichia coli* Uropatogênica. 2. Infecções por *Escherichia coli*. 3. Infecção do Trato Urinário. 4. Filogenia. 5. Virulência. I. Fadel-Picheth, Cyntia Maria Telles. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.372

# TERMO DE APROVAÇÃO

**CARLOS EDUARDO REU**

**Título: INCIDÊNCIA DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÃO URINÁRIA EM PACIENTES ATENDIDOS PELAS UNIDADES DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE CURITIBA E ANÁLISE GENÉTICA DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

  
Prof.ª Dr.ª Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth  
Orientadora

  
Prof. Dr. Sandro Germano  
Universidade Federal do Paraná

  
Dr.ª Laura Lúcia Cogo  
Hospital de Clínicas - UFPR

Curitiba, 19 de fevereiro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à Professora Cyntia pela oportunidade, confiança e pela segunda chance, que espero não ter desperdiçado.

Agradeço ao Professor Geraldo por me fazer entender o que de fato é um trabalho científico, e aos amigos Waldemar e Fátima pelas ideias e pelo tempo dedicado a este trabalho.

Obrigado aos colegas do Laboratório Municipal, do Hospital de Clínicas e do Laboratório de Bacteriologia da UFPR pelas incontáveis intervenções a meu favor.

Quero também agradecer a minha família pelo incentivo ao estudo desde sempre.

Em especial, agradeço à minha esposa Mileny pelo manejo das planilhas, pelo ouvido e pela paciência durante as minhas ausências de espírito.

*%D ignorante afirma, o sábio duvida, o sensato reflete.+*

Aristóteles

## RESUMO

Infecções do trato urinário (ITU) são muito frequentes, perdendo apenas para as respiratórias. Este trabalho determinou a incidência de bactérias causadoras de ITU em pacientes de Curitiba e realizou análise de grupos filogenéticos e fatores de virulência em 313 estirpes de *Escherichia coli*, o principal patógeno urinário. Pacientes foram divididos em classes levando-se em conta características que influenciam aquisição e desenvolvimento de ITU: mulheres abaixo de 14 anos, de 14-47 anos (idade fértil), gestantes, mulheres acima de 47 anos (climatério), diabéticas e homens. No geral, a bactéria *Escherichia coli* se confirmou como bactéria mais prevalente (54,7%), seguida por *Streptococcus agalactiae* (18,8%), *Proteus mirabilis* (5,6%), *Enterococcus* spp (5,2%), *Staphylococcus* spp (4,8%) e *Klebsiella* spp (3,9%). Houve diferença significativa na distribuição das bactérias entre as classes de pacientes. Com relação à filogenia de *E. coli*, o grupo D foi o que mais ocorreu, seguido pelos grupos A, B2 e B1 respectivamente. Entre os homens, porém, o grupo B2 foi mais frequente, e as diabéticas apresentaram distribuição diferente do restante das mulheres. Os fatores de virulência que mais ocorreram foram *traT* e *aer*, seguidos de PAI<sub>CFT073I</sub>, hemólise em ágar sangue, *sfa*, *pap*, *cnf1*, *afa*, formação de cápsula e *hly*. A ocorrência do gene *aer* foi significativamente maior entre as mulheres menores de 14 anos. Os grupos filogenéticos B2 e D apresentaram mais fatores de virulência que os grupos A e B1. Foram avaliadas as contagens de bactérias e de leucócitos do exame parcial de urina, sendo que as mulheres de 14-47 anos, independente de gestação, apresentaram mais bactérias que os demais. Mulheres abaixo de 14 anos e homens tiveram maior quantidade de leucócitos. O antibiograma também foi analisado: quinolonas apresentaram maior resistência entre os pacientes mais idosos. Na análise por grupos filogenéticos, B2 mostrou maior sensibilidade às quinolonas em relação aos outros grupos.

Palavras-chave: *Escherichia coli* uropatogênica, Infecções por *Escherichia coli*, Infecção do trato urinário, Filogenia, Virulência.

## ABSTRACT

The urinary tract infections (UTIs) are very common, second only to respiratory infections. This study determined the incidence of UTI-causing bacteria in patients from Curitiba and conducted analysis of phylogenetic groups and virulence factors in 313 *Escherichia coli* strains, the main urinary pathogen. The patients were divided in classes according to characteristics that influence the acquisition and development of UTI: women under 14 years, 14-47 years (childbearing age), pregnant women, women over 47 years (in menopause), diabetic women, and men. Overview, the *Escherichia coli* bacteria was confirmed as most prevalent (54,7%), followed by *Streptococcus agalactiae* (18,8%), *Proteus mirabilis* (5,6%), *Enterococcus* spp (5,2%), *Staphylococcus* spp (4,8%) and *Klebsiella* spp (3,9%). There were significant differences in the distribution of bacteria between classes of patients. In relation to the phylogeny of *E. coli*, group D was the most occurred, followed by groups A, B1 and B2 respectively. Among males, however, the group B2 was more common, and diabetic women had different distribution of the remaining women. The virulence factors that more occurred were *traT* and *aer*, followed by PAI<sub>CFT073I</sub>, hemolysis on blood agar, *sfa*, *pap*, *cnf1*, *afa*, *hly* and capsule formation. The occurrence of the *aer* gene was significantly higher among women younger than 14 years. The phylogenetic groups B2 and D had more virulence factors than groups A and B1. Were evaluated the bacterial and leukocyte count in urine: women between 14-47 years, pregnant or not, had more bacteria than the others. Women under than 14 years old and men had a higher number of leukocytes. The antibiogram was also analyzed: the quinolones showed higher resistance among older patients. The analysis by phylogenetic groups, B2 showed greater sensitivity to quinolones compared to other groups.

Key-words: Uropathogenic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* infections, Urinary tract infections, Phylogenetics, Virulence.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Fluxograma para determinação do grupo filogenético de <i>E. coli</i> ...	37
Figura 02. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% mostrando os produtos de amplificação de fragmentos dos genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e <i>tspE4C2</i> por PCR multiplex.....	49
Figura 03. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando produtos de PCR multiplex para genes de virulência em estirpes de UPEC.	52
Figura 04. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando produtos de amplificação da reação de PCR duplex para os genes de virulência PAI e <i>traT</i> .....	52
Figura 05. Quantidade de fatores de virulência por estirpe de UPEC, separado por grupos filogenéticos.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Classificação dos pacientes do LMC para a determinação da frequência dos uropatógenos.....	33
Tabela 02. Iniciadores da PCR multiplex para determinação da filogenia de <i>E. coli</i> .....	36
Tabela 03. Programa utilizado para a PCR multiplex para determinação do grupo filogenético de estirpes de <i>E. coli</i> .....	36
Tabela 04. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes de virulência associados com UPEC .....	38
Tabela 05. Programa utilizado na reação de PCR . Sistema 1. ....	38
Tabela 06. Programa utilizado na reação de PCR . Sistema 2. ....	39
Tabela 07. Resultados das culturas de urina por classe de pacientes.....	42
Tabela 08. Comparações com teste de qui-quadrado entre resultados positivos para urocultura entre as classes de pacientes .....	43
Tabela 09.Frequência de bactérias recuperadas de uroculturas positivas por classe de paciente .....	45
Tabela 10. Distribuição de grupos filogenéticos de UPEC por classe de pacientes.....	50
Tabela 11. Presença de fatores de virulência de UPEC por classe de paciente.....	54
Tabela 12. Positividade de fatores de virulência de UPEC por grupo filogenético.....	55
Tabela 13. Contagem de bactérias e leucócitos do exame parcial de urina, separados por classe de paciente.....	57
Tabela 14. Contagem de bactérias e leucócitos do exame parcial de urina, separados por grupo filogenético de UPEC. ....	58
Tabela 15. Resistência a antimicrobianos das estirpes de UPEC separada por classe de paciente. ....	60
Tabela 16. Resistência a antimicrobianos das estirpes de UPEC separada por grupo filogenético.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**aer:** gene que codifica o sideróforo aerobactina

**afa:** gene que codifica a adesina Afa

**cnf1:** gene que codifica o fator citotóxico necrosante 1

**DM:** *diabetes mellitus*

**dNTP:** desoxinucleotídeo trifosfato

**hly:** gene que codifica a hemolisina

**ITU:** infecção do trato urinário

**LMC:** Laboratório Municipal de Curitiba

**PAI:** *Pathogenicity Island* (ilha de patogenicidade)

**pap:** gene que codifica a adesina fimbrial P

**pb:** pares de bases

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

**sfa:** gene que codifica para a adesina fimbrial S

**traT:** gene que codifica TraT, uma proteína de membrana externa associada com a resistência ao soro

**UFC:** unidade formadora de colônia

**UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica**

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO .....	17
2.1.1 CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DAS ITU .....	18
2.1.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ITU.....	19
2.2 PARTICULARIDADES DE PACIENTES ACOMETIDOS POR ITU .....	20
2.2.1 ITU NA MULHER ADULTA .....	20
2.2.1.1 ITU Durante a Gestação.....	21
2.2.2 ITU NO HOMEM ADULTO .....	22
2.2.3 ITU NA CRIANÇA .....	22
2.2.4 ITU NO PACIENTE IDOSO.....	23
2.2.5 ITU NO PACIENTE DIABÉTICO .....	25
2.3 A BACTÉRIA <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	26
2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DA UPEC.....	27
2.4.1 ADESINAS .....	27
2.4.2 TOXINAS .....	28
2.4.3 SISTEMAS DE CAPTAÇÃO DE FERRO (SIDERÓFOROS) .....	29
2.4.4 RESISTÊNCIA AO SORO E FORMAÇÃO DE CÁPSULA .....	30
2.4.5 ILHAS DE PATOGENICIDADE (PAI).....	30
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 AMOSTRA .....	32
4.1.1 DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE UROPATÓGENOS .....	32
4.1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES.....	32
4.2 METODOLOGIA .....	33
4.2.1 AQUISIÇÃO DE INFORMAÇÕES DO LABORATÓRIO MUNICIPAL DE CURITIBA .....	33
4.2.1.1 Realização e interpretação das culturas de urina no LMC.....	33

4.2.1.2 Realização do exame parcial de urina no LMC .....	34
4.2.1.3 Resistência das UPEC aos antimicrobianos.....	34
4.2.2 ANÁLISE GENÉTICA DE ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> .....	35
4.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA .....	35
4.2.4 DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DAS ESTIRPES DE <i>E. coli</i> .....	35
4.2.5 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE <i>E. coli</i> .....	37
4.2.6 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	39
4.2.7 DETERMINAÇÃO DE PRODUÇÃO DE HEMÓLISE E FORMAÇÃO DE CÁPSULA.....	39
4.2.8 MÉTODOS ESTATÍSTICOS .....	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO .....	41
5.2 INCIDÊNCIA DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE ITU .....	44
5.3 ANÁLISE GENÉTICA DE UPEC .....	49
5.3.1 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE UPEC	49
5.3.2 DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE UPEC.	51
5.3.3 RELAÇÃO ENTRE GRUPOS FILOGENÉTICOS E A PRESENÇA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE UPEC .....	55
5.3.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS E DE LEUCÓCITOS DO EXAME PARCIAL DE URINA DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA UPEC .....	57
5.3.5 RESISTÊNCIA DAS UPEC AOS ANTIMICROBIANOS .....	58
5.3.5.1 Resistência a antimicrobianos e as classes de pacientes .....	58
5.3.5.2 Resistência a antimicrobianos e os grupos filogenéticos.....	61
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as doenças infecciosas mais comuns em humanos (FOXMAN, 2002; BIEN, SOKOLOVA & BOZKO, 2012). As ITU são mais frequentes em mulheres que nos homens, atingindo uma proporção de 30:1 na idade adulta. Nos idosos a relação cai para cerca de 2:1 (MATSUMOTO, 2001).

Pacientes portadores de ITU podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas que variam de simples desconforto urinário, cistite, pielonefrite, a complicações que podem resultar em insuficiência renal aguda e bacteremia podendo inclusive levar à morte (FOXMAN, 2000; FRENCH, 2006; BIEN, SOKOLOVA & BOZKO, 2012).

Dentre os microrganismos causadores de infecção urinária, a bactéria *Escherichia coli* é a mais prevalente, causando cerca de 80% dos casos dos ITU. O restante fica por conta de outros bacilos gram-negativos, especialmente enterobactérias, e cocos gram-positivos (FRENCH, 2006).

*E. coli* faz parte da microbiota normal do intestino, no entanto algumas estirpes adquiriram características que as tornam capazes de causar uma variedade de infecções em humanos e animais. Estas estirpes podem ser classificadas de acordo com o sítio anatômico onde podem causar doença como *E. coli* diarreogênicas, que incluem vários patótipos capazes de causar infecção intestinal; e *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) incluindo as associadas com infecções do trato urinário (UPEC) e meningite/sepsis (MNEC) (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). Uma característica dessas estirpes é a produção de fatores de virulência especializados que lhes conferem o potencial patogênico, e que são infrequentes entre as estirpes comensais (JOHNSON & STELL, 2000). A virulência é uma característica multifatorial, e os genes de virulência podem estar localizados em elementos móveis como plasmídeos, fagos, transposons, ou então em ilhas de patogenicidade inseridas nos cromossomos (MUHLDORFER & HACKER, 1994; KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

As estirpes de *E. coli* uropatogênica (UPEC) podem expressar uma variedade de fatores de virulência como adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro, entre outras características, que permitem à bactéria

colonizar a uretra e bexiga, evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro, persistir no trato urinário e causar infecção (JOHNSON & STELL, 2000).

As estirpes de UPEC apresentam um elevado grau de diversidade genética devido à localização dos genes de virulência em elementos genéticos móveis (BIEN, SOKOLOVA & BOZKO, 2012).

Análises filogenéticas mostram que as estirpes de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos principais (A, B1, B2, e D) ocorrendo variações entre as linhagens extra-intestinais e comensais (CLERMONT et al., 2000).

Considerando que as infecções urinárias estão entre as mais comuns em humanos, esse trabalho tem por objetivo determinar a incidência dos agentes etiológicos de ITU em uma população assistida pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e determinar os grupos filogenéticos e fatores de virulência em estirpes de *E. coli* uropatogênica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

Em condições normais, o trato urinário é considerado um ambiente estéril, em que o fluxo normal da urina e a presença de algumas moléculas endógenas com atividade antimicrobiana mantém o sistema livre de bactérias. Todavia as infecções do trato urinário (ITU) são muito comuns em todo o mundo (MUHLDOERFER et al., 2001).

Pacientes portadores de ITU podem ou não apresentar sintomas, que variam de simples desconforto urinário, até bacteremia ou sepse, podendo inclusive levar à morte (FOXMAN, 2000; FRENCH, 2006).

Infecções urinárias geralmente se iniciam com a colonização do cólon do indivíduo pela bactéria, que depois ascende, via uretra, e adere ao epitélio urinário. Essa rota é reforçada em indivíduos com significativa contaminação do períneo com fezes, mulheres que usam agentes espermicidas e pacientes com catéteres. Da bexiga, a bactéria pode atingir os ureteres e ascender para os rins. Esse processo é facilitado se a bactéria possuir adesinas específicas ou se algum processo interferir com a função peristáltica normal do ureter (WALSH et al., 2002; CHUNG et al., 2010).

Além da rota ascendente, a rota hematogênica também pode ser utilizada pelas bactérias para causar ITU. Nesta situação os rins podem ser secundariamente infectados em pacientes com bacteremia (WALSH, et al., 2002). A infecção através desta rota é restrita a microrganismos tais como: *Staphylococcus aureus*, *Candida* spp., *Salmonella* spp. e *Mycobacterium tuberculosis* (GRABE et al, 2008).

A maioria das ITU é causada por um único patógeno, embora infecções mistas possam ocorrer e necessitem de tratamento mais complexo (WAGENLEHNER & NABER, 2004).

Os patógenos bacterianos mais frequentemente associados com ITU incluem bacilos gram-negativos tais como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., e cocos gram-positivos como *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp e *Streptococcus agalactiae* (estreptococo  $\beta$ -hemolítico do grupo B) (FRENCH, 2006).

Mais de 80% das infecções urinárias em pacientes ambulatoriais são atribuídas a *E. coli*, que é mais comum em meninas com menos de 10 anos e mulheres entre 20 e 40 anos. A incidência em homens é muito menor, provavelmente graças à maior distância entre o cólon e a entrada da uretra masculina, que também está numa região menos colonizada. Além disso, a uretra do homem tem um comprimento maior, dificultando o processo de invasão do trato urinário pela bactéria (CHUNG et al., 2010).

A obstrução do fluxo urinário é fator chave para o aumento da susceptibilidade a ITU. A estase resultante compromete os mecanismos de defesa renais e contribui para o aumento da concentração de bactérias na urina, facilitando sua aderência às células epiteliais (SCHAEFFER, 2001).

A severidade da infecção é determinada pela virulência da bactéria infectante e pelos mecanismos de defesa inata do hospedeiro (RAGNASDÓTTIR et al., 2008). Um importante agente da defesa inata é o TLR4 (*Toll-Like-Receptor 4*), que ao reconhecer determinados ligantes (como lipopolissacarídeo, por exemplo) inicia respostas contra a ITU. Entre as ações do TLR4 na bexiga estão a inibição da invasão e a expulsão de bactérias das células epiteliais, além do estímulo da secreção das interleucinas 6 e 8. Outro receptor de neutrófilos (CXCR1) está envolvido com sua migração para os locais infectados. Variações genéticas de TLR4 e CXCR1 estão relacionadas com a suscetibilidade ou proteção às diferentes manifestações de ITU (YIN et al., 2010).

### 2.1.1 CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DAS ITU

Tradicionalmente, as infecções do trato urinário são classificadas de modo simplificado em: não complicadas, complicadas e urosepse. No entanto, elas podem ser classificadas mais detalhadamente de outras formas: anatomicamente, pelos achados microbiológicos ou pela avaliação dos fatores de risco (GRABE et al., 2011).

Anatomicamente, as ITUs podem ser classificadas em uretrite, cistite, pielonefrite e urosepse. Quanto aos achados microbiológicos, a espécie encontrada pode ser suscetível à maioria dos antibióticos, com sensibilidade

reduzida ou multiresistente. Já a classificação pelos fatores de risco é a seguinte:

- sem fatores de risco conhecidos (mulheres saudáveis em idade fértil, por exemplo);
- risco de infecção recorrente não severa (atividade sexual, uso de DIU, etc.);
- risco extra-urogenital com possibilidade de agravamento (gravidez, gênero masculino, neonatos e outros);
- nefropatia com risco de agravamento (insuficiência renal, rins policísticos);
- risco urológico transitório (obstrução uretral por cálculo, cirurgia urológica, etc.) (GRABE et al., 2011).

## 2.1.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ITU

Desde 1956 a cultura quantitativa de urina tem sido utilizada para diagnóstico de ITU. Após estudos realizados por Edward Kass, foi implantado o critério da presença do patógeno em contagem igual ou superior a 100.000 unidades formadoras de colônia por mL ( $>10^5$  UFC/mL). No entanto entre os anos 60 e 70 estudos adicionais mostraram que a contagem de colônias em urina de mulheres com infecção urinária poderia ser menor que  $10^5$  UFC/mL. Estas mulheres apresentavam disúria e piúria e mesmo assim, segundo o critério de Kass, teriam o diagnóstico negativo (MAHON & MANUSELIS, 1995).

A partir de 1980 a síndrome uretral aguda foi definida como causa de disúria e piúria acompanhadas pelo crescimento de microrganismos com contagem de colônias superior a  $10^3$  e inferior a  $10^5$  UFC/mL. Em 1982, Stamm e colaboradores aprimoraram o critério para diagnóstico de ITU com a inclusão da contagem de colônias superior a  $10^2$  UFC/mL, complementado pela presença de piúria na urina sedimentada. Portanto tornou-se claro que não existe um valor fixo de bacteriúria que possa ser aplicado em todas as circunstâncias (GRABE et al., 2011).

## 2.2 PARTICULARIDADES DE PACIENTES ACOMETIDOS POR ITU

### 2.2.1 ITU NA MULHER ADULTA

Mulheres com sintomas sugestivos de cistite são muito comuns na prática médica. Uma em cada três mulheres desenvolvem ao menos uma infecção urinária durante a vida (CHUNG, 2010).

A microbiota do aparelho geniturinário feminino é dinâmica e dependente de fatores hormonais. Em situação de normalidade, é clara a prevalência de *Lactobacillus* spp. Uma mudança dos níveis hormonais pode predispor à colonização por bactérias do cólon ou mesmo aumentar a quantidade de outros organismos comensais da vagina e aumentar o risco de infecção urinária (HEISLER & GEBHART, 2008).

Alguns fatores genéticos também podem predispor ao desenvolvimento de ITU e sua recorrência. Por exemplo, as mulheres que expressam os antígenos HLA-A3 e os dos grupos sanguíneos de Lewis LE(a-b) ou LE(a+b-) tem maior risco de ITU recorrente, aparentemente por causa da similaridade antigênica com as bactérias em questão. Outros mediadores podem desempenhar um papel na ITU, tais como a expressão reduzida de CXCL8, um receptor para a interleucina 8, ou secreção inadequada de imunoglobulina A (HEISLER & GEBHART, 2008). Entre as mulheres saudáveis com cistite, a infecção ocorre em 25% das mulheres dentro de 6 meses após o primeiro episódio (HOOTON, 2012).

Além de componentes genéticos, outros fatores contribuem para o desenvolvimento de ITU, tais como a higiene geniturinária, a atividade sexual, a anatomia pélvica, o estado hormonal e por consequência a idade. Mulheres sexualmente ativas tem maior risco de desenvolver infecção. Mulheres que usam como métodos contraceptivos o gel espermicida e o diafragma também tem risco aumentado para ITU (CHUNG, 2010; HOOTON, 2012).

Diferenças anatômicas podem predispor a aquisição de ITU. Um estudo que comparou a distância entre a uretra e o ânus de mulheres com ITU e de mulheres saudáveis, comprovou que as portadoras de infecção tinham maior proximidade entre os orifícios (HEISLER & GEBHART, 2008).

### 2.2.1.1 ITU Durante a Gestação

A gravidez é um estado que traz alterações importantes na anatomia e na fisiologia do aparelho geniturinário, as quais favorecem o surgimento de infecção. Ocorre dilatação das pelvis renais e ureteres graças à compressão dos ureteres e à redução da atividade peristáltica provocada pela progesterona, levando à estase urinária (HEISLER & GEBHART, 2008). Os rins perdem eficiência e concentram menos a urina, diminuindo as propriedades antibacterianas (HEILBERG & SCHOR, 2003).

A ITU é a complicação médica mais comum na gravidez, com 1 a 2% das gestantes apresentando sintomas, e 2 a 13% acometidas por bacteriúria assintomática. Destas, 20 a 40% progridem para pielonefrite caso não sejam tratadas (GILSTRAP & RAMIN, 2001).

Para o feto, a ITU na gravidez envolve um risco de 40% de ocorrência de parto prematuro, retardo de crescimento, e baixo peso ao nascer. Para as mães, as complicações incluem insuficiência ou falência renal, sepse, e a síndrome do desconforto respiratório do adulto. Por esses motivos, recomenda-se fortemente a realização de uma cultura de urina em todas as mulheres grávidas na primeira consulta do exame pré-natal e uma repetição no terceiro trimestre. Em caso de positividade, uma cultura de controle de cura deve ser realizada uma semana após o término do tratamento com antibióticos (GILSTRAP & RAMIN, 2001).

A recorrência de infecções do trato urinário afeta aproximadamente uma em cada 3 mulheres grávidas com diagnóstico de ITU (HEISLER & GEBHART, 2008).

A bacteriúria é mais frequentemente causada por *E. coli*, porém o estreptococo  $\beta$ -hemolítico do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) que ocorre com uma frequência entre 1 e 2% na população em geral, cresce para 1 a 5% nas gestantes. A colonização inicia-se geralmente através da ascensão do microrganismo desde a vagina, onde pode permanecer sem causar sintomas. No entanto, mais de 7% das gestações podem se complicar devido a ITU por esta bactéria. Das gestantes que desenvolvem pielonefrite, o *S. agalactiae* é responsável por cerca de 10% dos casos. Além disso, pode causar corioamnionite, parto prematuro e a transmissão vertical do microrganismo,

inclusive com sepse neonatal. É recomendada a utilização de antibióticos durante o parto como profilaxia (ULETT et al., 2009; WINN, 2007).

### 2.2.2 ITU NO HOMEM ADULTO

Infecções urinárias são menos prevalentes em homens que em mulheres, porém aumentam drasticamente com a idade nos pacientes masculinos. ITU não complicada no homem jovem é rara, devendo-se investigar anormalidades anatômicas, cálculos renais, obstrução ou histórico de instrumentação geniturinária recente (GRIEBLING, 2005).

Cistite e pielonefrite são diagnósticos que ocorrem em ambos os gêneros, mas algumas formas de ITU são exclusivas do homem. Entre elas está a hiperplasia prostática benigna, que obstrui a saída da bexiga causando estase urinária. Outra situação é a instrumentação na região das vias urinárias, como cateterismo, coletas para biópsias, ultrasonografia transretal, comumente utilizadas para diagnóstico e controle de doenças relacionadas ao aparelho geniturinário masculino (ULLERYD et al., 2001).

A bacteriúria no homem pode dar origem a cistite, pielonefrite, prostatite, abscessos prostáticos, e até osteomielite e sepse (GRIEBLING, 2005).

### 2.2.3 ITU NA CRIANÇA

No primeiro ano de vida, especialmente nos 3 primeiros meses, a ITU é mais comum em meninos (3,7%), que em meninas (2%). Após esse período a incidência muda para 3% em meninas e 1,1% em meninos (GRABE et al., 2011)

Em populações pediátricas as ITU são associadas com morbidade significativamente maior e com mais consequências de longo prazo em relação a adultos, tais como insuficiência renal, hipertensão, complicações da gravidez quando adulto. Em crianças com fatores de risco, ITU recorrentes podem aumentar a progressão a pielonefrite e provocar cicatriz renal (MARKS et al., 2008).

A circuncisão pode conferir relativa proteção contra ITU nos meninos por diminuir a colonização bacteriana periuretral na primeira infância, especialmente por *Proteus mirabilis* (GLENNON et al., 1988).

Depois do primeiro episódio de ITU, muitas crianças podem ter uma ITU recidiva ou recorrente, e a maioria delas ocorre de 3 a 6 meses após a primeira manifestação. A probabilidade de recidiva ou recorrência parece ter relação com a idade em que ocorreu a infecção inicial. Por exemplo, a taxa de ITU recorrente em crianças que adquirem ITU antes de um ano de idade é de 18% para meninos e 26% para meninas. Já se a infecção ocorreu em um menino de mais de 1 ano, 32% serão novamente acometidos por ITU. Para meninas, o risco de nova ITU dentro de um ano é proporcional ao número de infecções anteriores. Assim, o risco de recidiva ou recorrência dentro de 1 ano é maior que 25% para as que apresentaram uma ITU anteriormente, e maior que 75% para as que apresentaram 3 ITU anteriores (SHORTLIFFE, 2002).

Meninas com ITU recorrentes e fatores de risco tais como refluxo vesico-ureteral apresentam maior risco de desenvolver pielonefrite e por consequência cicatrização renal e doença progressiva dos rins na vida adulta. Cerca de 20 a 60% das crianças com bacteriúria apresentam refluxo vesico-ureteral (MARKS et al., 2008).

Estudos indicam que crianças que desenvolvem cicatrizes renais decorrentes de pielonefrite, mesmo que unilateralmente, tem maior risco de apresentar complicações graves a longo prazo, incluindo uma menor massa renal, menor taxa de filtração glomerular e possivelmente hipertensão arterial diastólica (SHORTLIFFE, 2002).

#### 2.2.4 ITU NO PACIENTE IDOSO

As infecções urinárias correspondem a quase um quarto de todas as infecções que acometem a população idosa, perdendo em importância apenas para a pneumonia (LIANG & MACKOWIAK, 2007).

A prevalência de bacteriúria é de cerca de 20% nas mulheres e 10% nos homens com idade superior a 65 anos. A porcentagem de mulheres com mais de 80 anos afetadas pela bacteriúria varia entre 25 e 50%. Um estudo realizado

na Islândia detectou que 35% das mulheres com 80 anos ou mais já tinha desenvolvido ao menos um episódio de ITU, e que 11% passaram por 5 ou mais infecções. A proporção de mulheres jovens com bacteriúria é de aproximadamente 30:1 em relação aos homens da mesma idade. Nos idosos é de apenas 2:1 (MATSUMOTO, 2001).

O envelhecimento do sistema imunológico desempenha um papel importante no aumento da vulnerabilidade dos idosos a qualquer tipo de infecção. A diversidade de células T fica limitada com a idade por causa da depleção do reservatório de células T virgens. Assim, o controle delas sobre as células B se torna deficiente e antígenos estranhos podem não ser reconhecidos como tal. A imunidade inata (células fagocíticas e *natural killers*) continua a funcionar razoavelmente bem (LIANG & MACKOWIAK, 2007).

Outras alterações decorrentes da velhice como desnutrição, má circulação, e fragilidade das barreiras mecânicas naturais, colaboram ainda mais para o surgimento de infecções. A estase urinária é comum entre homens e mulheres nessa faixa etária por causa da deterioração estrutural e funcional do músculo detrusor, responsável pela contração e consequente esvaziamento da bexiga (LIANG & MACKOWIAK, 2007).

Cistocelos, ureterocelos e divertículos de bexiga também são fontes de estase em homens e mulheres. A compressão dos ureteres por câncer ou hiperplasia prostática benigna pode causar obstrução urinária. Em mulheres idosas, a diminuição da secreção de estrogênio e as gestações anteriores podem resultar numa frouxidão dos ligamentos do assoalho pélvico e de outras estruturas que podem levar ao esvaziamento incompleto da bexiga e incontinência urinária. Nos pacientes idosos com histórico de acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, e bexiga neurogênica é comum ocorrer estase urinária e refluxo ureteral, fazendo com que o aparelho urinário fique propenso à colonização e infecção bacteriana. Em alguns pacientes, a prostatite, os cálculos renais e de bexiga servem como reservatório de microrganismos geradores de infecção persistente, assim como o aumento da colonização bacteriana periuretral nas mulheres após a menopausa (LIANG & MACKOWIAK, 2007).

*E. coli* é a bactéria mais prevalente em ambos os sexos nessa faixa etária, e comumente apresentam menor suscetibilidade a antibióticos como

ampicilina, cefalotina e quinolonas do que pacientes mais jovens. Um dos motivos é o acumulado uso empírico de antibióticos, por isso não se recomenda que idosos com bacteriúria assintomática sejam tratados (VARLI, et al., 2012).

### 2.2.5 ITU NO PACIENTE DIABÉTICO

Vários estudos sugerem que bacteriúria assintomática e ITU ocorrem com maior frequência em mulheres diabéticas do que naquelas que não possuem a doença. Além disso, o risco para desenvolvimento de pielonefrite e consequente declínio da função renal também estão aumentados nas pacientes com *Diabetes mellitus* (STAPLETON, 2002).

Não existem relatos, porém, de maior frequência de bacteriúria em homens diabéticos em relação aos não diabéticos (HEILBERG & SCHOR, 2003).

Alguns fatores têm sido propostos para explicar a fisiopatologia de ITU em portadores de diabetes, tais como a diminuição da atividade nos neutrófilos devido ao ambiente hiperosmolar e a microangiopatia, com consequente diminuição da irrigação sanguínea no local. O papel da glicosúria ainda é muito discutido, não tendo sido comprovada sua associação com maior colonização bacteriana (GRABE et al., 2011).

O aparecimento de complicações mais raras como a cistite enfisematosa e infecções fúngicas são intimamente relacionados com a doença. Por isso, embora a bacteriúria assintomática não seja motivo de maiores preocupações nas pacientes saudáveis, nas diabéticas necessita de uma atenção especial (STAPLETON, 2002).

*Diabetes mellitus* também aumenta o risco de pielonefrite aguda por enterobactérias provenientes do trato urinário inferior, especialmente *Klebsiella* spp, com uma incidência de 25% em comparação a 12% na ausência da doença (GRABE et al., 2011).

### 2.3 A BACTÉRIA *Escherichia coli*

A família Enterobacteriaceae, na qual *E. coli* está inserida, representa a maior e mais heterogênea categoria de bacilos Gram-negativos de importância clínica. As bactérias compreendidas nesta família são anaeróbios facultativos, fermentam a glucose, e não formam esporos. Não são exigentes nutricionalmente e crescem em uma variedade de meios de cultura (WINN JR et al., 2006).

*E. coli* tem como habitat natural o lúmen intestinal de animais de sangue quente. É um microrganismo extremamente versátil metabolicamente e geneticamente. Sua versatilidade também é observada enquanto patógeno humano, pois produzem diversas fímbrias e adesinas que permitem sua fixação no epitélio do hospedeiro, especialmente nos tratos gastrointestinal e urinário. Muitas produzem exotoxinas. O genoma das estirpes patogênicas geralmente é maior que o da *E. coli* K12, uma estirpe não patogênica, pertencente à microbiota intestinal, que contém aproximadamente 4.600.000 nucleotídeos e é capaz de codificar mais de 4 mil proteínas diferentes. Várias estirpes patogênicas têm genoma com cerca de 5 milhões de pares de bases, diversos genes associados com virulência, e apenas um núcleo de genes (pangenoma) é conservado entre todas as *E. coli* (OELSCHLAEGER et al., 2002; SALYERS & WHITT, 2002).

Análises filogenéticas mostram que as estirpes de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos principais designados A, B1, B2, e D e que as estirpes extra-intestinais virulentas pertencem principalmente ao grupo B2, e em menor grau, ao grupo D, enquanto que a maioria das estirpes comensais pertencem ao grupo A (CLERMONT et al., 2000).

*E. coli* uropatogênica (UPEC) é responsável pela maioria das ITU, e consegue isso graças a uma base genética que permite a colonização e a sobrevivência em nichos específicos do hospedeiro, bem como à disponibilidade de um arsenal de fatores de virulência (ZHANG et al., 2000).

## 2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DA UPEC

O genoma bacteriano é constituído de um cerne gênico comum a todos os membros da espécie, que contém os genes essenciais, relacionados às funções celulares básicas, e um conjunto flexível de genes, específico de cada linhagem bacteriana e responsável por atividades adicionais relacionadas a cada ambiente particular (SLAVCHEV, 2009).

Esses genes adicionais estão presentes nos elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, fagos e ilhas de patogenicidade. São eles os responsáveis pela codificação dos fatores de virulência, que permitem ao microrganismo invadir e se adaptar rapidamente a um ambiente desfavorável (WILES et al., 2008).

Um estudo recente realizado no país, no qual estirpes de *E. coli* uropatogênicas foram analisadas quanto à presença de vários marcadores de virulência incluindo a ilha de patogenicidade PAI<sub>CFT073</sub>, adesinas *sfa*, *pap* e *afa*, toxinas como *hly* e *cnf1*, mostrou que 90% das bactérias apresentavam pelo menos um dos genes de virulência analisados (OLIVEIRA et al., 2011).

### 2.4.1 ADESINAS

As adesinas são consideradas os principais fatores de virulência da UPEC, permitem a adesão e invasão das células do trato urinário e ativam vias de sinalização tanto na bactéria, quanto no hospedeiro (BOWER et al., 2005).

A fímbria tipo 1, uma adesina distribuída de maneira uniforme entre estirpes comensais e patogênicas, é expressa em 90% de todas *E. coli*. É codificada pelo gene *fim1*, e sua subunidade ligadora possui várias isoformas, podendo se ligar a vários tipos celulares, muco e até mesmo superfícies abióticas. Parecem estar relacionadas à interação entre uma célula e outra, e consequente formação de biofilme.

A fímbria P, adesina presente em mais de 70% das estirpes causadoras de pielonefrite, recebe o nome justamente por este motivo (*pyelonephritis-associated pilus*). Codificada por um grupo de genes denominados *pap*, tem a

capacidade de se ligar especificamente a receptores presentes exclusivamente no epitélio renal (BOWER et al., 2005).

A fímbria S adere em resíduos de ácido siálico e ocorre em cerca de 35% das *E. coli* patogênicas extraintestinais. Codificada pelo gene *sfa*. É capaz de aderir ao endotélio renal e plasminogênio e está relacionada às estirpes capazes de causar sepse, meningite, e infecção do trato urinário superior (BOWER et al., 2005).

Em aproximadamente 14% das UPEC pode-se encontrar adesinas homólogas à fímbria S, denominadas *pili* F1C, que se ligam a glicolipídeos presentes nas células endoteliais, túbulos distais e ductos coletores dos rins, além da bexiga. São codificadas pelos genes *foc* (SLAVCHEV, 2009).

O grupo de adesinas Dr é composto pela adesina fimbrial Dr e pelas não fimbriais, Nfa-I, Dr-II, Afa I, Afa II, Afa III e Afa IV. Elas reconhecem sequências consenso de aminoácidos curtas e repetidas num receptor de complemento presente nos eritrócitos e em outros tecidos, incluindo o trato urinário. Esse receptor denomina-se DAF (*decay accelerating factor*), e é mais expresso durante a gravidez, podendo estar relacionado à maior suscetibilidade das gestantes a ITU (MULVEY, 2002). Achados clínicos e laboratoriais sugerem que as estirpes de UPEC capazes de produzir Afa apresentam propriedades que favorecem o estabelecimento de infecção crônica ou recorrente (BIEN et al., 2012).

#### 2.4.2 TOXINAS

A  $\alpha$ -hemolisina é uma toxina proteica codificada pelo *operon hlyCABD*, que pode estar localizado tanto numa ilha de patogenicidade, como em plasmídio. Após ser secretada pela bactéria, esta toxina liga-se a um receptor da célula alvo (eritrócitos, granulócitos, monócitos e células endoteliais), e se insere na membrana formando canais de aproximadamente 2 nm, o que desestabiliza os gradientes de concentração e rompe a membrana (WILES et al., 2008).

O fator citotóxico necrotizante é uma toxina capaz de induzir uma ampla reorganização do citoesqueleto de actina da célula através da ativação

permanente da proteína Rho. É internalizada pelos endossomas da célula hospedeira e posteriormente liberada no citoplasma, onde exercerá sua função. É codificada pelo gene cromossomal *cnf1* (WILES et al., 2008).

A toxina autotransportadora secretada (SAT) é uma protease que atua nos resíduos de serina das proteínas responsáveis pela organização do citoesqueleto, provocando danos glomerulares e efeitos citopáticos em vários tipos celulares. É capaz de induzir uma forte produção de anticorpos. Codificada pelo gene *sat*, gera uma proteína madura de 107 kDa (MARONCLE et al., 2006).

#### 2.4.3 SISTEMAS DE CAPTAÇÃO DE FERRO (SIDERÓFOROS)

O ferro é um micronutriente limitante para as bactérias no hospedeiro, sendo a aquisição de ferro pela bactéria vital no processo infeccioso uma vez que é necessário para a síntese de várias enzimas do metabolismo, como as que atuam no transporte de elétrons, entre outras. Porém nos fluidos do hospedeiro, a grande maioria do ferro encontra-se indisponível por estar complexado com proteínas (JOHNSON, 2003).

O principal sistema de captação de ferro da UPEC denomina-se aerobactina, determinada pelo gene *aer*, que consiste em uma molécula pequena formada pela condensação de duas lisinas e um citrato. Após a secreção pela bactéria, a aerobactina capta  $Fe^{3+}$  das proteínas conjugadas com ferro do hospedeiro, e o entrega à célula. Devido às suas pequenas proporções, não é capaz de induzir a produção de anticorpos (SLAVCHEV, 2009).

A enterobactina também é uma proteína captadora de ferro da UPEC, porém seu mecanismo é menos eficiente que a aerobactina. Além disso, a enterobactina necessita de um nível maior de privação de ferro para começar a ser produzida (WILES et al., 2008).

#### 2.4.4 RESISTÊNCIA AO SORO E FORMAÇÃO DE CÁPSULA

A resistência ao soro envolve modificações na superfície externa da bactéria que impedem o reconhecimento pelos anticorpos do hospedeiro. Essas alterações podem ser através de cápsula, lipopolissacarídeos ou proteínas de origem plasmideal, como a expressa pelos genes *traT* (JOHNSON, 2003).

A lipoproteína TraT é uma proteína de membrana externa envolvida na interação entre a célula bacteriana e o meio onde está o microrganismo. Foi observado que TraT aumenta a sobrevivência das células frente ao soro, sugerindo que afeta a resistência da bactéria à ação lítica do complemento. Este tipo de resistência é um dos principais fatores de virulência de bactérias invasivas que causam infecção generalizada (SUKUPOLVI & O'CONNOR, 1990).

As cápsulas de polissacarídeo que recobrem a célula bacteriana (antígenos K) interferem na detecção pelo hospedeiro dos antígenos O. Normalmente as cápsulas de UPEC são finas, desiguais, termoestáveis, ácidas e aniônicas. Também apresentam a característica de dificultar a opsonização e consequente fagocitose (JOHNSON, 2003).

#### 2.4.5 ILHAS DE PATOGENICIDADE (PAI)

Ilhas de patogenicidade representam amplas regiões cromossômicas que normalmente codificam genes de virulência. A proporção de C+G nessas regiões é diferente do restante do cromossomo, indicando troca de material genético entre espécies. Embora possível, não é comum a presença de PAI em estirpes não patogênicas. São comumente inseridos na região 3q dos genes que codificam RNA transportador e algumas ilhas são instáveis, apresentando a tendência de serem removidas do cromossomo (MIDDENDORF et al., 2004).

Já foram descritas várias PAI em UPEC. Na estirpe *E. coli* 536, isolada de pielonefrite, foram detectados 4 tipos diferentes de ilhas de patogenicidade. Na estirpe *E. coli* J96, também de recuperada de pielonefrite, 2 tipos. E na estirpe *E. coli* CFT073, ao menos 7 PAI foram detectadas (VIEIRA, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a incidência de bactérias causadoras de infecção urinária em pacientes atendidos pelas unidades de saúde do município de Curitiba, caracterizar geneticamente estirpes de *E. coli* e verificar se há associações entre os genótipos e achados laboratoriais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a incidência de ITU entre as diferentes classes de pacientes analisadas.
- Verificar a ocorrência de associações estatisticamente significativas entre as classes de pacientes e identidade dos uropatógenos isolados.
- Pesquisar a presença de fatores de virulência e definir o grupo filogenético de estirpes de *E. coli* selecionadas de cada classe de pacientes.
- Comparar os achados laboratoriais da análise da urina e a suscetibilidade a antimicrobianos das estirpes de *E. coli* considerando os fatores de virulência, grupos filogenéticos e respectivas classes de paciente das quais foram isoladas.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este trabalho faz parte do projeto "Incidência de bactérias causadoras de infecção urinária nos pacientes atendidos pelas unidades de saúde do município de Curitiba", aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - UFPR sob o número de registro CEP/SD: 1225.150.11.90, CAAE: 0143.0.091.085-11, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba sob o número 95/2011.

### **4.1 AMOSTRA**

A coleta da urina foi realizada por micção espontânea, sendo o jato médio da primeira urina do dia coletada em frasco seco e estéril encaminhada para o laboratório. Bolsas coletoras foram utilizadas para a coleta da urina em crianças pequenas.

Foram avaliados 64.562 resultados de cultura de urina provenientes de pacientes ambulatoriais, o que representa o total de uroculturas realizadas no Laboratório Municipal de Curitiba no período de 1º de novembro de 2011 a 31 de outubro de 2012.

#### **4.1.1 DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE UROPATÓGENOS**

Para a verificação da incidência de bactérias causadoras de ITU, foram utilizados os resultados de exames de pacientes realizados no Laboratório Municipal de Curitiba (LMC) no período de 1º de novembro de 2011 a 31 de outubro de 2012.

#### **4.1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES**

Os pacientes foram classificados em 7 grupos descritos na Tabela 01:

**Tabela 01. Classificação dos pacientes do LMC para a determinação da frequência dos uropatógenos**

Classe	Descrição
<b>Mulheres</b>	
0-13 anos	Crianças e meninas em puberdade*
14-47 anos	Mulheres em idade fértil, não gestantes
Gestantes	Mulheres com gestação em curso
>47 anos	Mulheres em climatério**
Diabéticas	Mulheres diabéticas***
<b>Homens</b>	
0-13 anos	Crianças
>13 anos	Em puberdade e adultos****

\* TAVARES et al., 2000; \*\* PALACIOS et al., 2010; \*\*\* AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; \*\*\*\* JØRGENSEN et al., 1991

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 AQUISIÇÃO DE INFORMAÇÕES DO LABORATÓRIO MUNICIPAL DE CURITIBA

A aquisição de dados foi realizada através do sistema de informática do Laboratório Municipal de Curitiba: *LabSystem* (Shift Consultoria e Sistemas, São José do Rio Preto, SP), que dispõe de uma ferramenta de geração de dados estatísticos.

#### 4.2.1.1 Realização e interpretação das culturas de urina no LMC

As amostras de urina foram semeadas em meio cromogênico CPS ID 3 (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), que permite a identificação direta da maioria das bactérias *E. coli*, *Enterococcus* spp e *Proteus* através da morfologia colonial, coloração desenvolvida em consequência da utilização dos substratos cromogênicos ( . glucuronidase e . glucosidade), atividade de deaminase e prova do indol

([http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?open=BRZ\\_CLN\\_PRD&doc=BRZ\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_21&pubparams.sform=2&lang=pt\\_br](http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?open=BRZ_CLN_PRD&doc=BRZ_CLN_PRD_G_PRD_CLN_21&pubparams.sform=2&lang=pt_br)). As demais espécies foram identificadas de maneira automatizada pelo

sistema Vitek 2 Compact (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), que também foi utilizado para a realização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos ([http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?open=BRZ\\_CLN\\_PRD&doc=BRZ\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_74&pubparams.sform=1&lang=pt\\_br](http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?open=BRZ_CLN_PRD&doc=BRZ_CLN_PRD_G_PRD_CLN_74&pubparams.sform=1&lang=pt_br)). Para as bactérias da espécie *S. agalactiae* a identificação foi realizada pelo teste de CAMP (WINN JR et al. 2006).

Foram consideradas positivas as uroculturas em que houve o desenvolvimento de um tipo de bactéria com contagem de colônias superior a  $10^4$  UFC/mL. Para o estudo genético de *E. coli*, foram selecionadas apenas culturas com contagem superior a  $10^5$  UFC/mL.

#### 4.2.1.2 Realização do exame parcial de urina no LMC

Foram analisadas as contagens de bactérias e de leucócitos do exame parcial de urina realizado pelo Laboratório Municipal de Curitiba nas diferentes classes de pacientes em estudo.

O exame parcial de urina foi realizado no equipamento UF1000i (Roche), que realiza a contagem de bactérias e de leucócitos por citometria de fluxo fluorescente. Esta versão do aparelho cora material genético com polimetina e dispõe de um canal exclusivo para detecção de bactérias, o que evita confusão de partículas biológicas com inertes como, por exemplo, cristais ([http://www.roche.com.br/fmfiles/re7193008/diagnostica/Distribuidores/Hematologia/folder\\_uf1000i\\_urisys2400.pdf](http://www.roche.com.br/fmfiles/re7193008/diagnostica/Distribuidores/Hematologia/folder_uf1000i_urisys2400.pdf)).

#### 4.2.1.3 Resistência das UPEC aos antimicrobianos

Os antimicrobianos testados no Laboratório Municipal de Curitiba foram: ampicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, cefalotina, ceftazidima, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, gentamicina, sulfazotrim e nitrofurantoína. Informações sobre 313 amostras foram coletadas.

Os resultados foram separados por classes de paciente, e as comparações realizadas através do teste do qui-quadrado. O mesmo foi feito com relação aos grupos filogenéticos.

#### 4.2.2 ANÁLISE GENÉTICA DE ESTIRPES DE *Escherichia coli*

Para a análise genética de *E. coli* uropatogênica, foram selecionadas aleatoriamente 313 estirpes isoladas de cultura de urina de pacientes atendidos pelo LMC, de acordo com as classes descritas na Tabela 01, exceto que os indivíduos do sexo masculino foram considerados num único grupo incluindo adultos e crianças. Desses pacientes foram catalogadas a suscetibilidade a antimicrobianos e a contagem de leucócitos e bactérias do exame parcial de urina.

#### 4.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

As estirpes de *E. coli* isoladas no LMC de pacientes com ITU foram mantidas em TSB/glicerol 20% a -80°C. Para a extração do DNA, as bactérias foram inoculadas em ágar McConkey, incubadas durante cerca de 18 horas a 37°C, e 4 colônias isoladas foram ressuspensas em 300 µL de água destilada estéril e incubadas em banho-maria fervente por 10 minutos. Após o resfriamento, a suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm, e o sobrenadante utilizado para *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (OLSVIK e STROCKBINE, 1993).

#### 4.2.4 DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DAS ESTIRPES DE *E. coli*

A determinação dos grupos filogenéticos foi realizada por PCR multiplex conforme descrito por CLERMONT et al., (2000). As informações sobre os oligonucleotídeos iniciadores e as condições de reação estão indicadas nas Tabelas 02 e 03.

**Tabela 02. Iniciadores da PCR multiplex para determinação da filogenia de *E. coli***

Iniciador	Sequência 5'3'	Tamanho (pb)
<i>chuA.1</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
<i>chuA.2</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA.1</i>	TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG	211
<i>yjaA.2</i>	ATGGAGAATGCGTTCTCAAC	
TspE4C2.1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

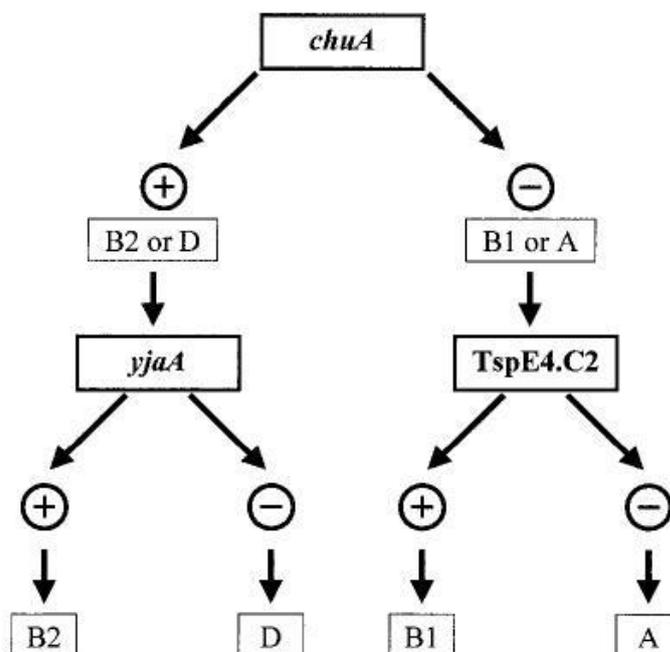
As reações foram realizadas em volume final de 25 $\mu$ L, contendo 4,0  $\mu$ L do extrato bruto de DNA, tampão da Taq DNA Polimerase 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, DNTP 0,2 mM, 8 pmol dos iniciadores *chuA*, 12 pmol dos iniciadores *yjaA*, 10 pmol dos iniciadores TspE4C2 e Taq DNA Polimerase 1U (Fermentas).

As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA).

**Tabela 03. Programa utilizado para a PCR multiplex para determinação do grupo filogenético de estirpes de *E. coli*.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação	94	4	1
Desnaturação	94	1	
Anelamento	59	0,5	30
Extensão	72	0,5	
Extensão	72	5	1

Após a reação de PCR e verificação dos produtos de amplificação (item 4.2.6), as estirpes foram classificadas de acordo com o critério recomendado por CLERMONT et al., (2000) representado na Figura 1.



**Figura 01. Fluxograma para determinação do grupo filogenético de *E. coli*.**

Fonte: Clermont et al. (2000).

#### 4.2.5 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE *E. coli*

Dois ensaios distintos de PCR multiplex foram usados para detectar a presença de genes de virulência nas estirpes de *E. coli*. O primeiro ensaio (Sistema 1) inclui iniciadores desenhados por YAMAMOTO et al. (1995) para os genes alvo *pap* (pilus associados com pielonefrite), *afa* (adesina afimbrial), *sfa* (fímbrias S), que codificam para adesinas; *hly* (hemolisina) e *cnf1* (fator necrosante citotóxico 1), e *aer* para o sideróforo aerobactina. O segundo é um ensaio duplex (Sistema 2), que contém os iniciadores PAI, para a detecção de um marcador da ilha de patogenicidade de *E. coli* pielonefritogênica UPEC CFT073, e o gene *traT* associado com a resistência ao soro (JOHNSON e STELL, 2000; OLIVEIRA et al., 2011). As informações sobre os iniciadores estão contidas na Tabela 04.

**Tabela 04. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes de virulência associados com UPEC**

Iniciadores	Sequência 5'3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>pap3</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	Yamamoto et al., 1995
<i>pap4</i>	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
<i>sfa1</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	Yamamoto et al., 1995
<i>sfa2</i>	CGGAGGAGTAATTACAACCTGGCA		
<i>afa1</i>	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	750	Yamamoto et al., 1995
<i>afa2</i>	CATCAAGCTGTTTGTTCGCCGCCG		
<i>hly1</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	Yamamoto et al., 1995
<i>hly2</i>	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		
<i>aer1</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	Yamamoto et al., 1995
<i>aer2</i>	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG		
<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498	Yamamoto et al., 1995
<i>cnf2</i>	CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT		
PAI F	GGACATCCTGGTACAGCGCGCA	930	Johnson & Stell, 2000
PAI R	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC		
<i>traTF</i>	GGTGTGGTGGGATGAGCACAG	290	Johnson & Stell, 2000
<i>traTR</i>	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG		

Os ensaios de PCR foram realizados em um volume final de 25 mL, contendo DNA (4 µL do extrato), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, Taq DNA polimerase 1U (Fermentas), tampão de Taq DNA polimerase 1X, e primers 0,4 mM. O programa utilizado no termociclador para o primeiro ensaio de PCR está indicado na Tabela 05, e para o segundo na Tabela 06.

**Tabela 05. Programa utilizado na reação de PCR - Sistema 1.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação	94	4	1
Desnaturação	94	1	
Anelamento	63	0,5	30
Extensão	72	3	
Extensão	72	7	1

**Tabela 06. Programa utilizado na reação de PCR É Sistema 2.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação	94	4	1
Desnaturação	94	0,5	
Anelamento	63	0,5	25
Extensão	68	3	
Extensão	72	10	1

As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems).

#### 4.2.6 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

A detecção de produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2 ou 2,5% em tampão TBE 1X (89 mM TRIS, ácido bórico 89 mM, EDTA mM 2, pH 8,3). As corridas duraram cerca de 90 minutos a 40 V. Os géis foram corados com brometo de etídio 0.5 g/mL, visualizados sob luz UV (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989) e as imagens registradas utilizando o equipamento UVP Imaging System.

#### 4.2.7 DETERMINAÇÃO DE PRODUÇÃO DE HEMÓLISE E FORMAÇÃO DE CÁPSULA

As estirpes de UPEC foram semeadas em ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas a 35°C durante cerca de 18 horas. Após foi observada a presença de halo de hemólise em volta das colônias, indicando a produção de hemolisina e a formação de colônias gomosas, indicando a produção de cápsula bacteriana (WINN JR et al, 2006).

#### 4.2.8 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas *Microsoft Excel 2010* e *Statistica for Windows*, versão 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Foram utilizadas as estatísticas descritivas (mediana, intervalo interquartil [25-75%] e os testes de qui-quadrado e Kruskall-Wallis para comparações entre grupos em tabelas 2X2. Comparações de dados em tabelas com múltiplas colunas e linhas (r x c) foram realizadas com os programas disponíveis em

[http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact\\_NROW\\_NCOLUMN\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.html) para o teste exato de Fisher e

[http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency\\_NROW\\_NCOLUMN\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency_NROW_NCOLUMN_form.html) para o teste do qui-quadrado.

Foram considerados como estatisticamente significativos valores de probabilidade menor que 5% ( $P < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

Das 64.562 amostras de urina analisadas, 47.032 (72,9%) tiveram resultado negativo, 6.408 (9,9%) amostras foram rejeitadas por contaminação (desenvolvimento de várias espécies), e 11.122 (17,2%) mostraram resultado positivo. A respeito da contaminação das amostras, foi observada taxa de contaminação mais elevada entre as crianças (Tabela 07). Isso provavelmente é devido à utilização da bolsa coletora, que permite contato da urina com a pele da criança e, eventualmente, com fezes (AL-ORIFI et al., 2000).

A frequência de culturas positivas é condizente com os resultados apresentados por DROMIGNY et al. (2002) que relatam 1.266 (17,9%) exames positivos num universo de 7.075 amostras ambulatoriais. DIMITROV et al. (2003), demonstraram um índice de positividade de 11,4%, com 1.606 resultados positivos num total de 14.042 uroculturas. Este valor é inferior ao encontrado neste estudo, provavelmente devido à utilização de critérios mais restritos para considerar as amostras positivas (contagem superior a  $10^5$  UFC/mL). Outros trabalhos, porém, mostram resultados bastante distintos com relação ao percentual de amostras positivas. Entre eles, BAHADIN et al. (2011) citam 50% de positividade em seu estudo, enquanto que TI et al. (2003) citam 40,1%. Isso pode ocorrer como evidenciado no último trabalho, porque os pacientes que chegam até o laboratório não representam a totalidade daqueles acometidos por ITU. Nas infecções menos complicadas há a tendência de ocorrer tratamento empírico, o que selecionaria os casos mais graves para a realização de exames, aumentando falsamente a incidência de infecção (HOOTON, 2004). Outra possível interferência é a existência de programas de saúde preventiva que realizam exames pré-determinados, mesmo sem a ocorrência de sintomas específicos, fato que reduz o número de exames laboratoriais alterados (CURITIBA, 2012).

Os pacientes do presente estudo foram divididos em classes conforme as características que podem influenciar na aquisição e desenvolvimento de infecção urinária (Tabela 01). Os números referentes aos resultados de

culturas de urina de acordo com a classe dos pacientes estão descritos na Tabela 07.

**Tabela 07. Resultados das culturas de urina por classe de pacientes**

Classes	n	Culturas de urina (n=64562)		
		Negativas (%) n=47032 (72,9)	Contaminadas (%) n=6408 (9,9)	Positivas (%) n=11122 (17,2)
<b>Mulheres</b>				
0-13 anos	4889	3654 (74,7)	641 (13,1)	594 (12,2)
14-47 anos	15459	10914 (70,6)	1363 (8,8)	3182 (20,6)
Gestantes	27310	20335 (74,5)	2734 (10,0)	4241 (15,5)
>47 anos	5956	3735 (62,7)	575 (9,7)	1646 (27,6)
Diabéticas	2162	1373 (63,5)	252 (11,7)	537 (24,8)
<b>Homens</b>				
0-13 anos	2758	2044 (74,1)	442 (16,0)	272 (9,9)
>13 anos	6028	4977 (82,5)	401 (6,7)	650 (10,8)

Das 64.562 culturas de urina realizadas, 55.776 exames são de mulheres e 8786 de homens. Entre as mulheres a frequência de resultados positivos 18,3% (n=10.200) foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ) quando comparada a 10,5% (n=922) dos homens.

A Tabela 08 mostra os resultados da análise estatística realizada para comparar a frequência de uroculturas positivas entre as classes de pacientes. Nas pacientes do sexo feminino observa-se que a frequência de culturas positivas varia de 12,1% nas crianças a 27,6% nas pacientes no climatério. Entre homens adultos e crianças não há dispersão significativa (10,8% vs 9,9%) como a observada entre as mulheres.

**Tabela 08. Comparações com teste de qui-quadrado entre resultados positivos para urocultura entre as classes de pacientes**

Classes	Mulheres					Homens	
	0-13 anos	14-47 anos	Gestantes	>47 anos	Diabéticas	0-13 anos	>13 anos
<b>Mulheres</b>							
0-13 anos	---	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,010	<0,001
14-47 anos	<0,001	---	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Gestantes	<0,001	<0,001	---	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
>47 anos	<0,001	<0,001	<0,001	---	0,043	<0,001	<0,001
Diabéticas	<0,001	<0,001	<0,001	0,043	---	<0,001	<0,001
<b>Homens</b>							
0-13 anos	0,010	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	---	0,807
>13 anos	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,807	---

A frequência de culturas positivas por classe esta indicada entre parêntesis (%) conforme Tabela 07.

Os valores de probabilidade foram obtidos com o teste do chi-quadrado.

A diferença na incidência de ITU entre homens e mulheres é amplamente reconhecida. Exceto durante os primeiros meses de vida, as mulheres são muito mais suscetíveis à ITU que os homens (FOXMAN, 2002). A incidência é maior entre as mulheres de 20 a 30 anos sexualmente ativas, e naquelas na menopausa (NICOLLE, 2002). Os dados da Tabela 07 mostram que entre as mulheres não-diabéticas, a frequência de ITU foi maior naquelas em menopausa, seguidas das mulheres em idade entre 14 . 47 anos de idade.

Entre as diabéticas, a frequência de ITU (24,8%) foi superior à incidência observada entre as mulheres adultas (20,6%) ( $P < 0,001$ ). Isto está de acordo com relatos da literatura mostrando que diabetes aumenta o risco de ITU entre mulheres (FOXMAN, 2002; NICOLLE, 2002; STAPLETON, 2002).

Apesar dos resultados significativos devem ser levados em conta os fatos já citados sobre os pacientes com ITU não complicada realizarem menos exames de laboratório que aqueles com ITU mais severa, e sobre os programas de saúde preventiva que levam à realização de um maior número de exames em pacientes saudáveis. No caso deste estudo, existe a possível influência do programa Mãe Curitibana, que tem por protocolo a realização da

urocultura trimestral de todas as gestantes, independente dos sintomas apresentados (CURITIBA, 2012).

## 5.2 INCIDÊNCIA DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE ITU

A Tabela 09 contém as bactérias mais frequentemente isoladas nas culturas de urina de acordo com a classe de paciente. O grupo %outras+ contém uma série de bactérias, todas isoladas em frequência inferior a 2%.

Seis diferentes grupos de bactérias (*E. coli*, *S. agalactiae*, *P. mirabilis*, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp e *Klebsiella* spp) representam aproximadamente 93% dos microrganismos isolados de culturas de urina positivas.

Foram encontradas 6.080 (54,7%) culturas positivas para *E. coli*, microrganismo predominantemente isolado nesta população com frequência no geral cerca de três vezes superior ao segundo uropatógeno mais encontrado (*Streptococcus agalactiae*; 18,8%). Apesar da bactéria *E. coli* apresentar maior prevalência entre os agentes causadores de infecção urinária consolidada em múltiplos estudos, sendo responsável por até 80% das infecções (RONALD, 2002; WILSON e GAIDO, 2004; STAMM, 2006), existem diferenças importantes entre os artigos em relação à sua taxa de isolamento (WILSON e GAIDO, 2004). DE FRANCESCO et al. (2007) encontraram 61,1% de *E. coli* nas uroculturas positivas dos pacientes ambulatoriais de seu estudo, ao passo que BAHADIN et al. (2011), 74,5% e DROMIGNY et al. (2002) relatam 38,6%. O índice de prevalência para *E. coli* encontrado neste estudo, é similar ao relatado (53 a 72%) para pacientes ambulatoriais (WILSON e GAIDO, 2004).

Tabela 09 Ë Frequência de bactérias recuperadas de uroculturas positivas por classe de paciente

Classe	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Klebsiella spp</i>	Outras*	n
<b>Mulheres</b>	5740 (56,3%)	2022 (19,8%)	501 (4,9%)	480 (4,7%)	487 (4,8%)	356 (3,5%)	614 (6%)	10200
0-13 anos	366 (61,6)	28 (4,7)	51 (8,6)	53 (8,9)	29 (4,9)	24 (4,0)	43 (7,3)	594
14-47 anos	2101 (66,0)	423 (13,3)	144 (4,5)	113 (3,6)	187 (5,9)	118 (3,7)	96 (3,0)	3182
Gestantes	1741 (41,1)	1323 (31,2)	232 (5,5)	231 (5,4)	238 (5,6)	110 (2,6)	366 (8,6)	4241
>47 anos	1175 (71,4)	178 (10,8)	59 (3,6)	68 (4,1)	27 (1,6)	75 (4,6)	64 (3,9)	1646
Diabéticas	357 (66,5)	70 (13,0)	15 (2,8)	15 (2,8)	6 (1,1)	29 (5,4)	45 (8,4)	537
<b>Homens</b>	340 (37,0%)	74 (8,0%)	121 (13,0%)	101 (11,0%)	44 (4,8%)	76 (8,2%)	166 (18,0%)	922
0-13 anos	75 (27,5)	1 (0,4)	87 (32,0)	32 (11,8)	16 (5,9)	18 (6,6)	43 (15,8)	272
>13 anos	265 (40,9)	73 (11,2)	34 (5,2)	69 (10,6)	28 (4,3)	58 (8,9)	123 (18,9)	650
<b>Total</b>	6080 (54,7%)	2096 (18,8%)	622 (5,6%)	581 (5,2%)	531 (4,8%)	432 (3,9%)	780 (7,0%)	11122

\* Foram agrupadas bactérias que apresentaram frequência geral menor que 2%, com destaque para *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores representam o número de bactérias isoladas (e porcentagem).

Em relação à prevalência *Streptococcus agalactiae* foi o segundo patógeno mais comum, isolado de 2.096 culturas, o que corresponde a 18,8%. Esse índice é comparável ao encontrado por DROMIGNY et al. (2002) que relatam frequência de 14,3% de *S. agalactiae* nas infecções de trato urinário em estudo realizado em Dakar, Senegal. No entanto, a frequência aqui observada é superior à descrita em outros estudos, como o de DE FRANCESCO et al. (2007) que reportaram 7,0%, ALÓS (2005), que relatou 1,7%, e ULETT et al. (2008) 1,1%. Segundo revisão de WINN (2007), a frequência de *S. agalactiae* varia entre 1 a 5%, indicando que essa bactéria não é um agente muito comum de infecção de trato urinário, o que difere dos resultados obtidos para a população estudada neste trabalho.

A terceira bactéria mais prevalente foi *Proteus mirabilis* com 572 casos (5,6%), frequência esta em conformidade com outros estudos. DE FRANCESCO et al. (2007) encontraram 2,6% de *Proteus* spp, DIMITROV et al. (2004) relataram 3% e ALÓS (2005) mostrou 7,2%. Em revisão realizada por WILSON e GAIDO (2004), a frequência relatada de *Proteus* spp em pacientes ambulatoriais varia de 4 a 6%.

*Enterococcus* spp foi o patógeno com a quarta maior frequência, com 581 casos (5,2%). O índice está em conformidade com ALÓS (2005), que relatou 4,8%, e com DROMIGNY et al. (2002), que encontraram 6,6% de *E. faecalis*, a espécie mais encontrada do gênero associada com infecções em humanos (WINN JR et al., 2006). DIMITROV et al. (2003), no entanto reportaram um índice de 2,5%. Uma possível explicação é que esse último estudo avaliou apenas amostras com contagem de bactérias superior a  $10^5$  UFC/mL enquanto os demais, incluso o presente, consideraram positivas as culturas com contagem a partir de  $10^4$  UFC/mL. As diferentes frequências encontradas para este microrganismo são justificadas em trabalho de revisão realizado por WILSON e GAIDO (2004), que atribui ampla variação entre estudos realizados em populações de origens geográficas diferentes.

A quinta bactéria mais isolada foi *Staphylococcus* spp, que apareceu em 531 uroculturas (4,8%), também em conformidade com outros trabalhos da área, como por exemplo o de BAHADIN et al., que reportou 4,5%. ALÓS (2005) verificou que a incidência deste microrganismo cai substancialmente em

pacientes acima de 50 anos, o que também foi observado no presente estudo (Tabela 09).

Em sexto lugar ficou *Klebsiella* spp, com 432 casos (3,9%), frequência inferior à relatada na literatura. ALÓS (2005) encontrou 6,6%, Dromigny et al. (2002) reportaram 9,5% e De Francesco et al. (2007) relataram 5,6%. As classes das gestantes e das mulheres em idade fértil, que compreendem o maior número de amostras analisadas (Tabela 09), foram as que apresentaram menor prevalência desta bactéria. Portanto, é possível que a composição das classes de pacientes esteja diminuindo a incidência geral de *Klebsiella* spp em relação aos demais estudos da área, que não têm por hábito descrever seu universo amostral de forma categorizada.

Os seis microrganismos mais frequentes estão de acordo com os encontrados por ALÓS (2005) num estudo muito semelhante ao presente, apenas com pacientes ambulatoriais, considerando como positivas culturas com contagem a partir de  $10^4$  UFC/mL e com um *n* substancial: 2.674.

Outras bactérias, tais como demais enterobactérias, bacilos Gram negativos não fermentadores, demais estreptococos (exceto do grupo *viridans*) somam 780 amostras (7%), também muito próximo dos 6% que encontrou ALÓS (2005).

O teste do qui-quadrado foi realizado para avaliar possíveis diferenças na composição de bactérias entre as classes de pacientes. Todas as classes foram comparadas duas a duas, e a diferença se mostrou com  $P < 0,001$  em todos os casos. Conforme já se explicou, os estudos da área não têm por costume classificar pacientes da maneira como foi realizado no presente estudo, porém pontuam argumentos de maneira isolada que justificam diferenças particulares, conforme citado em algumas ocasiões no decorrer deste capítulo.

No geral *E. coli* (54,7%) foi o agente mais comumente recuperado das culturas de urina, seguido de *S. agalactiae* (18,8%). O mesmo foi observado entre as mulheres, nas quais a frequência de *E. coli* foi de 56,3% e a de *S. agalactiae* 19,8%. Entre os homens, no total, *E. coli* também foi o patógeno mais comumente recuperado da urina, no entanto a frequência observada (37%) é inferior àquela observada entre as mulheres, e *P. mirabilis* (13%) foi o segundo agente mais recuperado das uroculturas deste grupo de pacientes. A

frequência de *S. agalactiae* (8%) entre os homens foi superior apenas à de bactérias do gênero *Staphylococcus* (Tabela 09).

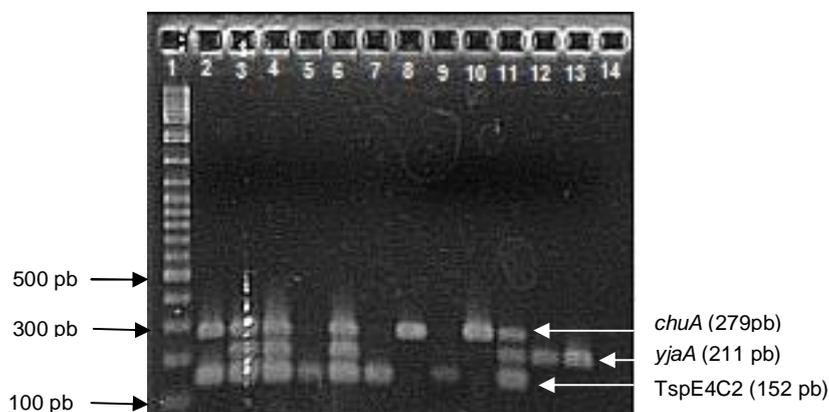
Entretanto, entre as gestantes a frequência de *S. agalactiae* foi de 31,2%, em média 2,5 vezes superior à encontrada entre as outras classes de pacientes adultas do sexo feminino (Tabela 09). Portanto, a elevada frequência de *S. agalactiae* encontrada neste estudo pode estar associada ao alto número de gestantes que realizam urocultura trimestral no Laboratório Municipal de Curitiba pelo Programa Mãe Curitibana.

A frequência de *P. mirabilis* destacou-se entre as crianças do sexo masculino, que no presente estudo apresentaram um índice bem superior às outras classes (32%), o que não chegou a afetar a percentagem geral devido ao número reduzido de amostras com este microrganismo em relação aos demais pacientes. Essa superioridade pode ser justificada devido à alta colonização periuretral por *P. mirabilis* na primeira infância (GLENNON et al., 1988).

## 5.3 ANÁLISE GENÉTICA DE UPEC

### 5.3.1 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE UPEC

Foram determinados os grupos filogenéticos de 313 estirpes de *E. coli* uropatogênica selecionadas de acordo com 6 classes de pacientes (item 4.1.3). A figura 1 representa os fragmentos amplificados para os marcadores (*chuA*, *yjaA* e *tspE4C2*) utilizados para determinar o grupo filogenético das estirpes de *E. coli* e alguns dos padrões de PCR multiplex observados.



**Figura 02. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% mostrando os produtos de amplificação de fragmentos dos genes *chuA*, *yjaA* e *tspE4C2* por PCR multiplex.** Coluna 1: marcador de massa molecular DNA Ladder (Fermentas). Coluna 2: produtos de amplificação dos genes *chuA* e *tspE4C2*, indicando grupo filogenético D. Colunas 3, 4, 6 e 11: produtos de amplificação dos genes *chuA*, *yjaA* e *tspE4C2*, indicando grupo filogenético B2. Colunas 5, 7 e 9: produtos de amplificação do fragmento *tspE4C2*, indicando grupo filogenético B1. Colunas 8 e 10: produtos de amplificação do gene *chuA*, indicando grupo filogenético D. Colunas 12 e 13: produto de amplificação do gene *yjaA*, indicando grupo filogenético A. Coluna 14: branco de reação.

A distribuição dos grupos filogenéticos de UPEC por classe de paciente está indicada na tabela 10.

**Tabela 10. Distribuição de grupos filogenéticos de UPEC por classe de pacientes.**

Grupos Filogenéticos	Mulheres					Homens	Total
	0-13 anos	14-47 anos	Gestantes	>47 anos	Diabéticas		
<b>A</b>	5/39 (12,8)	16/52 (30,8)	16/56 (28,6)	21/72 (29,2)	17/53 (32,0)	7/41 (17,1)	82/313 (26,2)
<b>B1</b>	4/39 (10,3)	6/52 (11,5)	6/56 (10,7)	6/72 (8,3)	12/53 (22,7)	10/41 (24,4)	44/313 (14,1)
<b>B2</b>	11/39 (28,2)	11/52 (21,2)	13/56 (23,2)	15/72 (20,8)	8/53 (15,1)	14/41 (34,1)	72/313 (23,0)
<b>D</b>	19/39 (48,7)	19/52 (36,5)	21/56 (37,5)	30/72 (41,7)	16/53 (30,2)	10/41 (24,4)	115/313 (36,7)

Os resultados são apresentados em fração e porcentual (%).

Entre as 313 estirpes de *E. coli* uropatogênicas analisadas, 82 (26,2%) pertencem ao grupo filogenético A, 44 (14,1%) ao grupo B1, 72 (23%) ao grupo B2 e 115 (36,7%) ao grupo D. Para a análise estatística, com a intenção de aumentar a amostra do teste, e por consequência a confiabilidade do cálculo, foram considerados o total das classes semelhantes para fins de comparação: homens comparados com o total de mulheres ( $P=0,028$ ); mulheres não diabéticas comparadas com mulheres diabéticas ( $P=0,027$ ); crianças do sexo feminino comparadas com o total de mulheres adultas ( $P=0,104$ ); gestantes comparadas com o total de mulheres não gestantes ( $P=0,918$ ).

A distribuição das UPEC entre os grupos filogenéticos não é homogênea nos estudos que abordam o assunto. Talvez o principal fator que interfira nas proporções encontradas nos diferentes estudos seja a origem da amostra. Como mostram os trabalhos de HAUDOUIN et al. (2007), e de SABATÉ et al. (2006), nas estirpes oriundas de pielonefrite e sepse, o grupo B2 tende a prevalecer, seguido de longe pelos grupos D, A e B1 respectivamente. Em amostras de ITU não complicada o grupo B2 não é prevalente, como evidenciam os estudos de ZHAO et al. (2009) e LOU et al. (2012), e as bactérias pertencentes ao grupo D são as mais frequentes, em conformidade com o presente estudo.

Outra possível fonte de interferência na distribuição dos grupos filogenéticos é a proporção de indivíduos do sexo masculino e feminino que

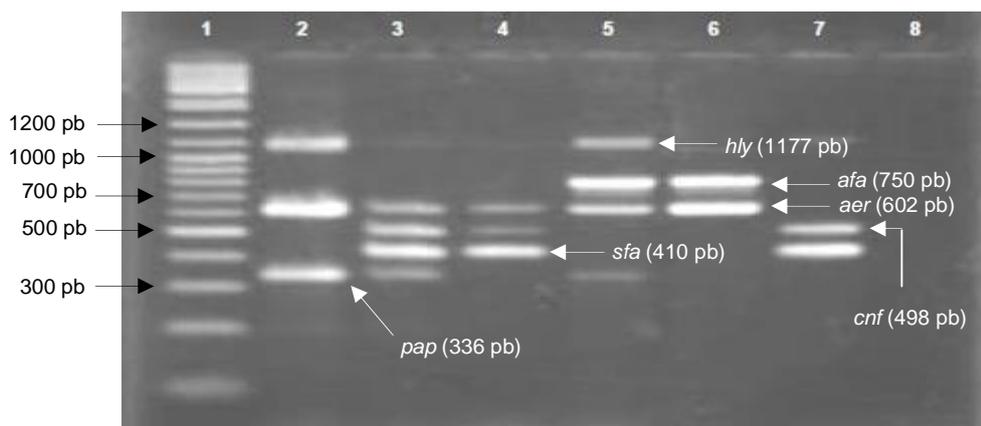
compõem a amostra. No presente trabalho apenas 13,1% das *E. coli* analisadas foram isoladas de pacientes do sexo masculino. Nestes foi observada maior frequência do grupo B2 (34,1%), seguido por B1 e D (24,4% cada) e A (17,1%). Entre as estirpes isoladas de mulheres o grupo filogenético prevalente foi o D (38,7%), seguido pelo A (26,4), B2 (21,6%) e B1 (13,3%). O estudo realizado por SKJ T-RASMUSSEN et al. (2012) também descreve o grupo D predominando entre as mulheres e o grupo B2 entre os homens.

A comparação entre as classes de pacientes evidenciou também que nas mulheres diabéticas a distribuição das estirpes de acordo com o grupo filogenético difere ( $P=0,027$ ) do observado nas mulheres não-diabéticas. Entre as diabéticas bactérias dos grupos filogenéticos A (32%) e D (30,2%), foram as mais frequentes seguidas pelas dos grupos B1 (22,7%) e B2 (15,1%) (Tabela 10). A maior frequência de estirpes do grupo A, está de acordo com os achados de Ghenghesh et al. (2009).

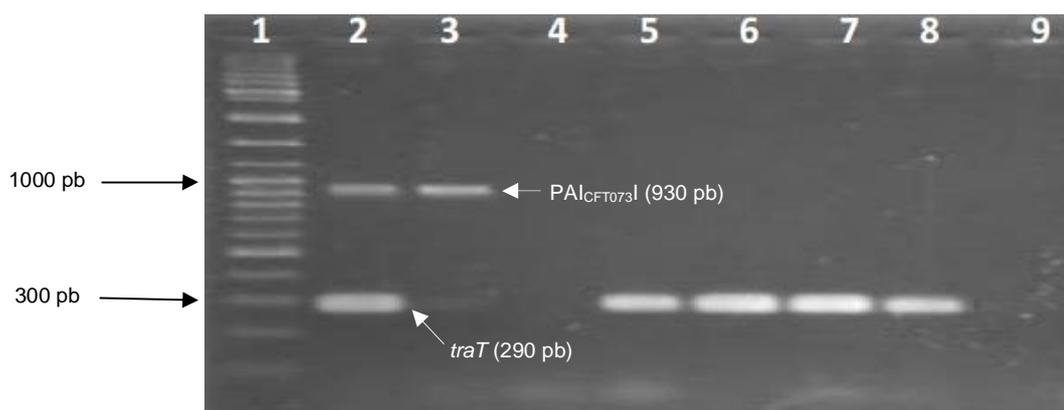
### 5.3.2 DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE UPEC

Foi determinada a presença dos genes de virulência *traT*, *pap*, *sfa*, *cnf1*, *aer*, *afa*, PAI, *hly*, além da hemólise em ágar sangue e formação de cápsula das 313 estirpes de UPEC.

As Figuras 02 e 03 representam padrões de amplificação para a detecção da presença de genes de virulência em estirpes de *E. coli* uropatogênica em reações de PCR-multiplex.



**Figura 03. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando produtos de PCR multiplex para genes de virulência em estirpes de UPEC.** Coluna 1: Marcador de massa molecular DNA Ladder (Fermentas). Coluna 2: produtos de reação dos genes *pap* (336 pb), *aer* (602 pb), *hly* (1177 pb). Coluna 3: produtos de amplificação dos genes *pap* (336 pb), *sfa* (410 pb), *cnf1* (498 pb), *aer*, Coluna 4: produto de amplificação dos genes *sfa* (410 pb), *cnf1* (498 pb), *aer* (602 pb). Coluna 5: produtos de amplificação dos genes *pap* (336 pb), *aer* (602 pb), *afa* (750 pb), *hly* (1177 pb). Coluna 6: produtos de amplificação dos genes *aer* (602 pb), *afa* (750 pb). Coluna 7: produtos de amplificação dos genes *sfa* (410 pb), *cnf1* (498 pb), *hly* (1177 pb). Coluna 8: Branco da reação.



**Figura 04. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando produtos de amplificação da reação de PCR duplex para os genes de virulência PAI e *traT*.** Coluna 1: marcador DNA Ladder (Fermentas). Colunas 2 e 3: produtos de amplificação dos genes PAI e *traT*. Coluna 4: estirpe com resultado negativo para os genes *traT* e PAI. Colunas 5, 6, 7 e 8: produto de amplificação do gene *traT*. Coluna 9: Branco da reação.

Foram encontradas 153 estirpes com o gene *traT* (48,9%), 46 com o gene *pap* (14,7%), 50 (16%) com *sfa*. Para o gene *cnf1*, 38 amostras se apresentaram positivas (12,1%), para *aer* 105 (33,5%), para *afa* 21 amostras (9,2%), para a ilha de patogenicidade *PAI<sub>CFT073I</sub>* foram 65 positivas (20,8%), e para o gene *hly*, 6 (1,9%). A formação de hemólise em ágar sangue ocorreu em

57 estirpes (18,2%), e a presença de colônias com presença de cápsula em 18 estirpes (5,8%).

Os resultados da análise da presença dos genes de virulência aparecem exatamente na mesma ordem de frequência no trabalho de OLIVEIRA et al. (2011), porém com menor percentagem em todos os genes pesquisados. A possível razão para o ocorrido é que o presente estudo conta apenas com amostras de ITU comunitárias, enquanto aquele contém tanto estirpes de pacientes ambulatoriais como hospitalares. O mesmo ocorreu em relação ao trabalho de PIATTI et al. (2007), que estudando estirpes isoladas de amostras de pacientes ambulatoriais e hospitalares, encontrou maiores frequências para *pap*, *cnf1* e *hly* em relação ao presente estudo.

O trabalho de BASHIR et al. (2012) demonstrou a ocorrência dos genes de virulência *pap*, *sfa*, *cnf1*, *afa* e *hly* em frequências superiores às encontradas neste trabalho. Este fato pode ser explicado devido à maior proporção de estirpes pertencentes ao grupo filogenético B2 em seu estudo, fato que será melhor explorado adiante.

A distribuição dos fatores de virulência de *E.coli* uropatogênica de acordo com as classes de pacientes está indicada na Tabela 11.

Foi encontrada diferença significativa apenas para a presença do gene *aer* ( $P < 0,001$ ) nas estirpes isoladas da categoria crianças, nas quais foi observada uma percentagem (64%) superior em relação às demais classes, que tiveram em média 28,3%. JACOBSON et al. (1990) encontraram situação semelhante, só que pesquisando a aerobactina já expressa, e não o gene codificador como no presente estudo.

A baixa positividade de *afa*, *hly* e formação de cápsula impediu a comparação através do teste do qui-quadrado, necessitando um maior número de amostras para tal averiguação. Para a produção de hemólise em ágar sangue de carneiro foi encontrado  $P = 0,058$ , valor muito próximo ao ponto de corte estabelecido para significância. Novo estudo com maior número de estirpes talvez ajude a elucidar a influência dessa característica no desenvolvimento de ITU nos diferentes grupos de pacientes. O estudo de fatores de virulência não é normalmente realizado por classes de paciente, fato que dificulta uma discussão mais aprofundada sobre o tema.

Tabela 11 Ë Presença de fatores de virulência de UPEC por classe de paciente.

Fatores de virulência	Mulheres					Homens	Total	P
	0-13 anos	14-47 anos	Gestantes	>47 anos	Diabéticas			
<i>traT</i>	24/39 (61,5)	26/52 (50,0)	25/56 (44,6)	33/72 (45,8)	25/53 (47,2)	20/41 (48,8)	153/313 (48,9)	0,653
<i>Pap</i>	7/39 (18,0)	5/52 (9,6)	14/56 (25,0)	8/72 (11,1)	5/53 (9,4)	7/41 (17,1)	46/313 (14,7)	0,132
<i>Sfa</i>	4/39 (10,3)	11/52 (21,2)	9/56 (16,1)	9/72 (12,5)	6/53 (11,3)	11/41 (26,8)	50/313 (16,0)	0,214
<i>cnf1</i>	4/39 (10,3)	9/52 (17,3)	10/56 (17,9)	7/72 (9,7)	3/53 (5,7)	5/41 (12,2)	38/313 (12,1)	0,244
<i>Era</i>	25/39 (64,1)	12/52 (23,1)	18/56 (32,1)	27/72 (37,5)	13/53 (24,5)	10/41 (24,4)	105/313 (33,5)	<0,001
<i>Afa</i>	5/39 (12,8)	2/52 (3,9)	6/56 (10,7)	6/72 (8,3)	1/53 (1,9)	1/41 (2,4)	21/313 (6,7)	0,155*
<b>PAI<sub>CFT073</sub>I</b>	8/39 (20,5)	10/52 (19,2)	14/56 (25,0)	15/72 (20,8)	8/53 (15,1)	10/41 (24,4)	65/313 (20,8)	0,817
<i>Hly</i>	1/39 (2,6)	1/52 (1,9)	3/56 (5,3)	1/72 (1,4)	0/53 (0)	0/41 (0)	6/313 (1,9)	0,398*
<b>Hemólise</b>	5/39 (12,8)	14/52 (26,9)	13/56 (23,2)	9/72 (12,5)	5/53 (9,4)	11/41 (26,8)	57/313 (18,2)	0,058
<b>Capsular</b>	0/39 (0)	1/52 (1,9)	2/56 (3,6)	5/72 (6,9)	6/53 (11,3)	4/41 (9,8)	18/313 (5,8)	0,113*

Tamanho amostral: 313

Os resultados são apresentados em fração e porcentual (%).

P, probabilidade com o teste de qui-quadrado em tabela de contingência.

\*probabilidade com o teste exato de Fisher em tabela de contingência exata.

### 5.3.3 RELAÇÃO ENTRE GRUPOS FILOGENÉTICOS E A PRESENÇA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE UPEC

Os fatores de virulência também foram categorizados por grupo filogenético. Foi realizado o teste de qui-quadrado para verificar se há diferença na distribuição de grupos filogenéticos em cada fator de virulência. Os dados são exibidos na Tabela 12.

**Tabela 12. Positividade de fatores de virulência de UPEC por grupo filogenético.**

Fatores de Virulência	Grupos Filogenéticos				Total	P
	A	B1	B2	D		
<i>traT</i>	31/82 (37,8)	22/44 (50)	41/72 (56,9)	59/115 (51,3)	153/313 (48,9)	0,103
<i>pap</i>	1/82 (1,2)	2/44 (4,5)	17/72 (23,6)	26/115 (22,6)	46/313 (14,7)	<0,001
<i>sfa</i>	0/82 (0)	3/44 (6,8)	26/72 (36,1)	21/115 (18,3)	50/313 (16,0)	<0,001
<i>cnf1</i>	0/82 (0)	0/44 (0)	17/72 (23,6)	21/115 (18,3)	38/313 (12,1)	<0,001
<i>aer</i>	22/82 (26,8)	7/44 (15,9)	24/72 (33,3)	52/115 (45,2)	105/313 (33,5)	0,001
<i>afa</i>	4/82 (4,9)	1/44 (2,3)	6/72 (8,3)	10/115 (8,7)	21/313 (6,7)	0,392*
PAI <sub>CFT073I</sub>	1/82 (1,2)	0/44 (0)	44/72 (61,1)	20/115 (17,4)	65/313 (20,8)	<0,001
<i>hly</i>	1/82 (1,2)	0/44 (0)	3/72 (4,2)	2/115 (1,7)	6/313 (1,9)	0,378*
hemolítica	1/82 (1,2)	2/44 (4,5)	33/72 (45,8)	21/115 (18,3)	57/313 (18,2)	<0,001
capsular	9/82 (11,0)	7/44 (15,9)	0/72 (0)	2/115 (1,7)	18/313 (5,8)	<0,001*

Tamanho amostral: 313.

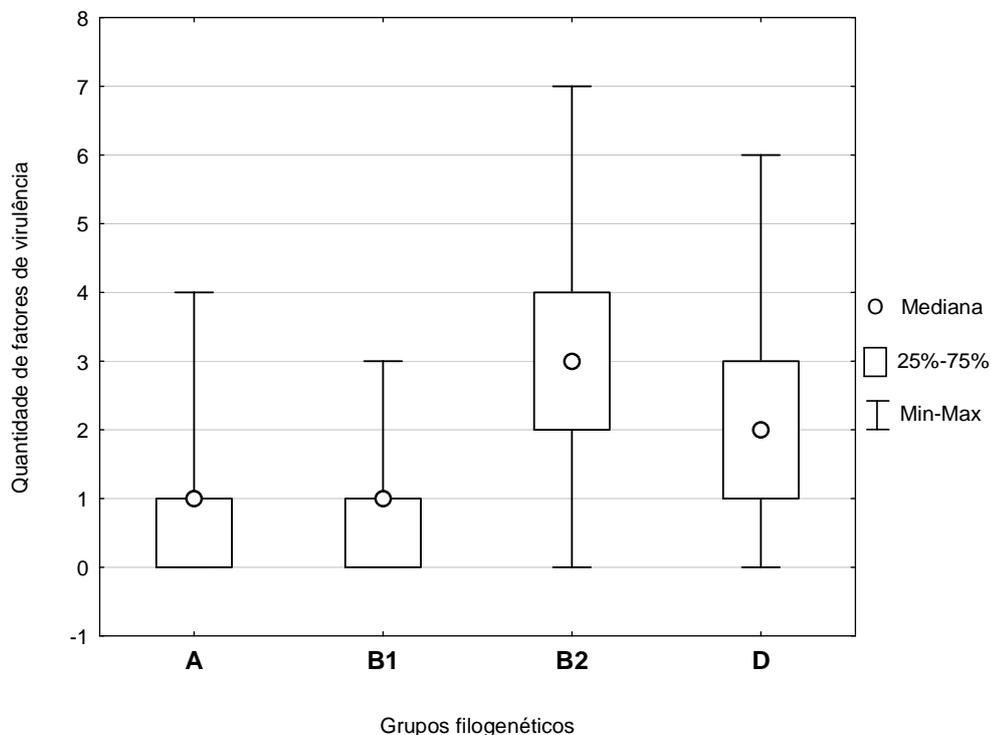
Os resultados são apresentados em fração e porcentual (%).

P, probabilidade com o teste de qui-quadrado em tabela de contingência.

\*probabilidade com o teste exato de Fisher em tabela de contingência exata.

Além disso, foi avaliada a quantidade fatores de virulência em cada estirpe de UPEC. A distribuição dos fatores de virulência é significativamente

diferente entre os grupos filogenéticos ( $P < 0,001$ ; teste de Kruskal-Wallis). Os grupos B2 e D apresentaram maior número de fatores de virulência como mostrado na Figura 05.



**Figura 05. Quantidade de fatores de virulência por estirpe de UPEC, separado por grupos filogenéticos.**

Os círculos abertos representam a mediana do número de fatores de virulência em cada grupo filogenético e os quadrados o intervalo interquartil (25%-75%).

Para os genes *pap*, *sfa*, *cnf1*, *aer*,  $PAI_{CFT073I}$ , e para a produção de hemólise em ágar sangue ( $P < 0,001$ ), ocorreram diferenças quanto a distribuição nas estirpes, com clara predominância nos grupos filogenéticos B2 e D. Resultados semelhantes mostrando predomínio de fatores de virulência entre estirpes dos grupos B2 e D foram relatados por CLERMONT et al. (2000), PICARD et al. (1999) e PIATTI et al. (2008).

### 5.3.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS E DE LEUCÓCITOS DO EXAME PARCIAL DE URINA DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA UPEC

A tabela 13 contém os valores das contagens de bactérias e de leucócitos obtidos a partir do exame parcial de urina para as diferentes classes analisadas.

**Tabela 13. Contagem de bactérias e leucócitos do exame parcial de urina, separados por classe de paciente.**

Classes	n	Bactérias/ $\mu$ L	Leucócitos/ $\mu$ L
<b>Mulheres</b>			
0-13 anos	39	7671,3 (2878,9-21219,4)	182,4 (58,7-492,25)
14-47 anos	52	12717,6 (4820,5-22813,6)	73,9 (33,7-361,0)
Gestantes	56	15872,5 (7445,1-25913,5)	53,8 (25,2-204,7)
>47 anos	72	5131,7 (2128,4-14633,6)	42,7 (12,5-245,7)
Diabéticas	53	5750,1 (3008,9-13281,5)	76,8 (24,2-252,6)
<b>Homens</b>	41	8592,8 (4963,2-20998)	232,5 (53,3-1444,1)
<b>Total</b>	313	8570,7 (3189,7-19913,4)	80,6 (26,4-350,0)
<b>P</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>0,003</b>

Os valores são apresentados em mediana e intervalo interquartil (25-75%).  
P, probabilidade com o teste de Kruskal-Wallis.

Na divisão por classes de pacientes foi encontrada diferença significativa ( $P < 0,001$ ) na contagem de bactérias na urina por citometria de fluxo entre as diferentes classes de pacientes (Tabela 13). Os resultados mostraram que a contagem de bactérias é mais elevada entre as mulheres em idade fértil, sejam elas gestantes ou não. Já nos grupos Diabéticas e >47anos a quantidade de células bacterianas diminui. Nas meninas e nos homens a contagem de bactérias é intermediária à observada nas demais classes de pacientes. Tais achados sugerem que possivelmente características do hospedeiro, como idade e gênero, e doença subjacente influenciem a quantidade de microrganismos na de urina.

Em relação ao número de leucócitos na urina também foi observada diferença significativa entre as classes de pacientes (Tabela 13). Contagens

mais elevadas foram observadas nas classes %Homens+ e %13 anos+ em relação às demais classes que englobam mulheres em idade adulta ( $P=0,003$ ).

Também foi realizada análise estatística para verificar se bactérias dos diferentes grupos filogenéticos diferem com relação à quantidade de bactérias presentes na urina e a reação leucocitária induzida no paciente. Os resultados estão indicados na Tabela 14.

**Tabela 14. Contagem de bactérias e leucócitos do exame parcial de urina, separados por grupo filogenético de UPEC.**

Grupos Filogenéticos	n	Bactérias/ $\mu$ L	Leucócitos/ $\mu$ L
A	82	7770 (2359,4-16947,3)	120,9 (41,0-319,3)
B1	44	13394 (6021,3-22376,7)	60,0 (23,2-281,9)
B2	72	8562 (2836,8-18370,3)	78,8 (32,5-304,4)
D	115	8051,8 (3250,9-20780,8)	66,3 (23,4-464,9)
<b>Total</b>	313	8570,7 (3189,7-19913,4)	80,6 (26,4-350,0)
<b>P</b>		<b>0,176</b>	<b>0,705</b>

Os valores são apresentados em mediana e intervalo interquartil (25-75%).  
P, probabilidade com o teste de Kruskal-Wallis.

Estes dois indicadores de infecção urinária não apresentaram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre as ITU causadas por estirpes dos diferentes grupos filogenéticos. Portanto, fica uma indicação preliminar, observada neste estudo, de que o grupo filogenético não tem efeito relevante sobre a resposta do hospedeiro em relação ao uropatógeno, quando a contagem de bactérias e leucócitos urinários é utilizada como indicador para este fim.

### 5.3.5 RESISTÊNCIA DAS UPEC AOS ANTIMICROBIANOS

#### 5.3.5.1 Resistência a antimicrobianos e as classes de pacientes

A Tabela 15 contém os resultados dos antibiogramas separados por classe de paciente. O teste do qui-quadrado foi aplicado a cada uma das drogas comparando as classes.

A resistência bacteriana aos antibióticos ampicilina ( $P=0,208$ ), cefalotina ( $P=0,371$ ), e sulfazotrim ( $P=0,094$ ) apresentou uma distribuição homogênea entre as classes de paciente. Em relação à amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima, gentamicina e nitrofurantoína foi observado um baixo índice de resistência. Nas quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina), onde  $P<0,001$ , se observou que as estirpes resistentes foram menos frequentes entre as crianças e as gestantes em relação aos demais pacientes. Estes dados podem ser decorrentes de um menor uso de antibióticos entre as classes crianças e gestantes. Ao contrário, a maior frequência de estirpes resistentes a esses antibióticos nos demais grupos provavelmente é reflexo da utilização prévia dessas drogas nas classes em que predominam pessoas de maior idade, e as diabéticas que podem apresentar infecções com maior frequência (Tabela 07). Tal achado está em concordância com o trabalho de GOBERNADO et al. (2007), que encontraram maior resistência à ciprofloxacina em mulheres maiores de 65 anos em relação às demais mulheres do estudo.

Tabela 15. Resistência a antimicrobianos das estirpes de UPEC separada por classe de paciente.

Classes	AMP	AMC	CFL	CAZ	GEN	NAL	CIP	NIT	SUT
<b>Mulheres</b>									
0-13 anos	22/39 (56,4)	6/39 (15,4)	19/39 (48,7)	1/39 (2,6)	0/39 (0)	3/39 (7,7)	1/39 (2,6)	5/39 (12,8)	16/39 (41,0)
14-47 anos	20/52 (38,5)	2/52 (3,8)	19/52 (36,5)	0/52 (0)	0/52 (0)	10/52 (19,2)	6/52 (11,5)	3/52 (5,8)	13/52 (25,0)
Gestantes	20/56 (35,7)	3/56 (5,4)	14/56 (25,0)	1/56 (1,8)	1/56 (1,8)	5/56 (8,9)	3/56 (5,4)	3/56 (5,4)	14/56 (25,0)
>47 anos	35/72 (48,6)	16/72 (22,2)	28/72 (38,9)	0/72 (0)	6/72 (8,3)	23/72 (31,9)	13/72 (18,1)	10/72 (13,9)	27/72 (37,5)
Diabéticas	24/53 (45,3)	7/53 (13,2)	24/53 (45,3)	3/53 (5,7)	3/53 (5,7)	22/53 (41,5)	15/53 (28,3)	5/53 (9,5)	21/53 (39,6)
<b>Homens</b>	23/41 (56,1)	4/41 (9,8)	18/41 (43,9)	6/41 (14,6)	4/41 (9,8)	18/41 (43,9)	14/41 (34,1)	6/41 (14,6)	20/41 (48,9)
<b>Total</b>	144/313 (46,0)	38/313 (12,1)	122/313 (39,0)	11/313 (3,5)	14/313 (4,5)	81/313 (25,9)	52/313 (16,6)	32/313 (10,2)	111/313 (35,5)
<b>P</b>	0,208	<b>0,021</b>	0,108	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,042*</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,439*	0,094

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina com ácido clavulânico; CFL: cefalotina; CAZ: ceftazidima; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; NIT: nitrofurantoína; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim.

Os resultados são apresentados em fração e porcentual (%). A resistência intermediária também foi computada como resistente.

P, probabilidade com o teste de qui-quadrado em tabela de contingência.

\*probabilidade com o teste exato de Fisher em tabela de contingência exata.

### 5.3.5.2 Resistência a antimicrobianos e os grupos filogenéticos

A Tabela 16 mostra os resultados dos antibiogramas separados por grupo filogenético de *E. coli*. O teste do qui-quadrado foi aplicado a cada um dos antimicrobianos para verificar possíveis diferenças entre os grupos.

A análise da distribuição da resistência aos antibióticos entre estirpes dos diferentes grupos filogenéticos indica que há uma diferença significativa em relação às quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina), enquanto nenhuma diferença foi observada para os demais antibióticos.

Para as quinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidíxico:  $P < 0,001$ ) observa-se que as estirpes resistentes predominam nos grupos filogenéticos A e B1.

Estudos mostram que de fato há relação entre a estrutura genética de *E. coli* e sua resistência a antimicrobianos, especialmente com relação às quinolonas, mas o fenômeno não é totalmente compreendido (PIATTI et al., 2008; KAWAMURA-SATO et al., 2010).

Estudos realizados com estirpes pertencentes ao grupo B2 relatam que as estirpes quinolona-sensíveis apresentam mais fatores de virulência do que aquelas quinolona-resistentes (DREWS et al., 2005; HORCAJADA et al., 2005). Não foi possível fazer tal análise no presente estudo por causa do baixo número de amostras quinolona-resistentes pertencentes ao grupo filogenético B2. SOTO et al. (2006) sugerem que essas drogas poderiam induzir à perda total ou parcial de ilhas de patogenicidade, uma possível explicação para a menor ocorrência de fatores de virulência nas estirpes resistentes, que apesar de sobreviverem à droga, sofrem consequências relevantes.

Tabela 16. Resistência a antimicrobianos das estirpes de UPEC separada por grupo filogenético

Grupos Filogenéticos	AMP	AMC	CFL	CAZ	GEN	NAL	CIP	NIT	SUT
<b>A</b>	33/82 (40,2)	9/82 (11,0)	34/82 (41,5)	5/82 (6,1)	5/82 (6,1)	30/82 (36,6)	21/82 (25,6)	11/82 (13,4)	24/82 (29,3)
<b>B1</b>	14/44 (31,8)	4/44 (9,0)	17/44 (38,6)	2/44 (4,5)	2/44 (4,5)	15/44 (34,1)	15/44 (34,1)	6/44 (13,6)	13/44 (29,5)
<b>B2</b>	39/72 (54,2)	10/72 (13,9)	28/72 (38,9)	0/72 (0)	3/72 (4,2)	12/72 (16,7)	2/72 (2,8)	2/72 (2,8)	26/72 (36,1)
<b>D</b>	58/115 (50,4)	15/115 (13,0)	43/115 (37,4)	4/115 (3,5)	4/115 (3,5)	24/115 (20,9)	14/115 (12,2)	13/115 (11,3)	48/115 (41,7)
<b>Total</b>	144/313 (46,0)	38/313 (12,1)	122/313 (39,0)	11/313 (3,5)	14/313 (4,5)	81/313 (25,9)	52/313 (16,6)	32/313 (10,2)	111/313 (35,5)
<b>P</b>	0,057	0,854	0,953	0,224	0,852	<b>0,011</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,113	0,257

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina com ácido clavulânico; CFL: cefalotina; CAZ: ceftazidima; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; NIT: nitrofurantoína; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim.

Os resultados são apresentados em fração e porcentual (%). A resistência intermediária também foi computada como resistente.

P, probabilidade com o teste de qui-quadrado em tabela de contingência.

\*probabilidade com o teste exato de Fisher em tabela de contingência exata.

## 6 CONCLUSÕES

As frequências de uroculturas positivas do LMC foram significativamente diferentes com relação a características dos pacientes, como gênero, idade e presença de diabetes, sendo as mulheres em climatério (27,6%) e diabéticas (24,8%) as que apresentaram maior índice de positividade.

*Escherichia coli* foi a bactéria mais incidente nas uroculturas realizadas de pacientes ambulatoriais (54,9%), seguida por *Streptococcus agalactiae* (18,8%).

A incidência do *Streptococcus agalactiae* em uroculturas positivas foi expressiva quando comparada a outros estudos, em especial em mulheres com idade fértil, gestantes (31,2%) e não gestantes (13,3%).

Entre as estirpes de UPEC estudadas, o grupo filogenético D foi prevalente (36,8%), seguido pelo grupo A (26,1%), grupo B2 (23%) e B1 (14,1%).

Mulheres com diabetes mostraram maior prevalência dos grupos filogenéticos A (32,1%) e B1 (22,6%) em relação aos demais grupos estudados.

A frequência do gene que codifica para o sideróforo aerobactina foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ) em mulheres entre 0 a 5 anos quando comparado as demais classes em estudo. Os demais fatores de virulência estudados apresentaram distribuição similar entre as classes estudadas.

A distribuição das características de virulência *pap*, *sfa*, *cnf1*, *aer*, PAI<sub>CFT073I</sub>, e hemólise em ágar sangue não foi homogênea entre os grupos filogenéticos ( $P < 0,001$ ). O grupo B2 está associado ao maior número de fatores de virulência.

Bactérias do grupo filogenético B2 apresentam maior suscetibilidade às quinolonas em relação aos demais grupos ( $P < 0,001$ ).

Os resultados do presente trabalho mostram que a epidemiologia das infecções do trato urinário está relacionada com as características dos pacientes como sexo, idade, gestação e diabetes.

## REFERÊNCIAS

AL-ORIFI, F.; MCGILLIVRAY, D.; TANGE, S.; KRAMER, M. S. Urine culture from bag specimens in young children. **The Journal of Pediatrics**. v. 137, p. 221-226, 2000.

ALÓS, J. I. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**. v. 23, n.4, p. 3-8, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 36, p. 67-74, 2013.

ANTÃO, E. M.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Adhesive threads os extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**. v. 1, p. 1-22, 2009.

BAHADIN, J.; TEO, S. S. H.; MATHEW, S. Aetiology of community-acquired urinary tract infection and antimicrobial susceptibility patterns of uropathogens isolated. **Singapore Medical Journal**. v. 52, n. 6, p. 415-420, 2011.

BASHIR, S.; HAQUE, A.; SARWAR, Y.; ALI, A.; ANWAR, M. I. Virulence profile of diferente phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 11, n. 23, 2012.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. **International Journal of Nephrology**. v.2012, 2012.

BOEHMER, E. D.; GORAL, J.; FAUNCE, D. E.; KOVACS, E. J. Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 75, p. 342-349, 2004.

BONADIO, M.; COSTARELLI, S.; MORELLI, G.; TARTAGLIA, T. The influence of diabetes mellitus on the spectrum of uropathogens and the antimicrobial resistance in elderly adult patients with urinary tract infection. **BMD Infectious Diseases**. v.6, n. 54, 2006.

BONAFÈ, M.; OLICIERI, F.; CAVALLONE, L.; GIOVAGNETTI, S.; MARCHEGANI, F.; CARDELLI, M.; PIERI, C.; MARRA, M.; ANTONICELLI, R.; LISA, R.; RIZZO, M. R.; PAOLISSO, G.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. A. Gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. **European Journal of Immunology**. v. 31, p. 2357-2361, 2001.

BOWER, J. M.; ETO, D. S.; MULVEY, M. A. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. **Traffic**. v. 6, p. 18-31, 2005.

CHEN, S. L. et al. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. **PNAS**. v. 113, n. 15, p. 5977-5982, 2006.

CHUNG, A.; ARIANAYAGAM, M.; RACHID, P. Bacterial cystitis in women. **Australian Family Physician**. v. 39, p. 295-298, 2010.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology** v. 66, p. 4555-4558, 2000.

CRAM, L. F.; et al. Genitourinary infections and their association with preterm labor. **American Family Physician**. v.65, p. 241-248, 2002.

CURITIBA. Pré-natal, parto, puerpério e atenção ao recém-nascido. **Secretaria Municipal de Saúde**, 2012.

DE FRANCESCO, M. A.; RAVIZZOLA, G.; PERONI, L.; NEGRINI, R.; MANCA, N. Urinary tract infections in Brescia, Italy: etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. **Medical Science Monitor**. v. 13, n. 6, p. 136-144, 2007.

DIMITROV, T. S.; UDO, E.E.; EMARA, M.; AWNI, F.; PASSADILLA, R. Etiology and antibiotic susceptibility patterns of community-acquired urinary tract infections in a Kuwait hospital. **Medical Principles and Practice**. v. 13, p. 334-339, 2003.

DREWS, S. J.; POUTANEN, S. M.; MAZZULLI, T.; MCGEER, A. J.; SARABIA, A.; PONG-PORTER, S.; RZAYEV, Y.; WILLEY, B.; GREEN, K.; LOW, D. E. Decreased prevalence of virulence factors among ciprofloxacin-resistant

uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 43, p. 4218-4220, 2005.

DROMIGNY, J. A.; NABETH, J. D.; CLAUDE, P. G. Distribution and susceptibility of bacterial urinary tract infections in Dakar, Senegal. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 20, p. 339-347, 2002.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. **American Journal of Medicine.** v.113, p.5S-13S, 2002

FOXMAN, B.; KI, M.; BROWN, P. Antibiotics resistance and pyelonephritis. **Clinical Infectious Diseases.** v.45, p. 281-283, 2007.

FRENCH, L. Urinary tract infection in woman. **Women's Health.** v.6, p. 24-29. 2006.

GHENGHESH, K. S.; ELKATEB, E.; BERBASH, N.; NADA, R. A.; AHMED, S. F.; RAHOUMA, A.; SEIF-ENASSER, N.; ELKHABROUN, M-A.; BELRESH, T.; KLENA, J. D. Uropathogens from diabetic patients in Libya: virulence factors and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates. **Journal of Medical Microbiology.** v. 58, p. 1006-1014, 2009.

GILSTRAP, L.C.; RAMIN, S. Urinary tract infections during pregnancy. **Medical Complications of Pregnancy.** v.28, p. 581-591, 2001.

GLENNON, J. et al. Circumcision and periurethral carriage of *Proteus mirabilis* in boys. **Archives of Disease in Childhood.** v.63, p. 556-557, 1988.

GOBERNADO, M.; VALDÉS, L.; ALÓS, J. I.; GARCÍA-REY, C.; DAL-RÉ, R.; GARCÍA-DE-LOMAS, J. Quinolone resistance in female outpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: age-related differences. **Revista Española de Quimioterapia.** v. 20, n. 2, p. 206-210, 2007.

GRABE, M. et al. The management of urinary and male genital tract infections. **European Association of Urology.** p. 7-116, 2008.

GRABE, M. et al. Guidelines on urological infections. **European Association of Urology.** p. 8-112, 2011.

GRIEBLING, T.L., Urologic diseases in America project: trends in resource use for urinary tract infections in men. **The Journal Of Urology**. v.173, p. 1288-1294, 2005.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário . ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.49, p.109-111, 2003

HEISLER, C. A.; GEBHART, J. B. Urinary tract infection in the adult female. **Journal of Pelvic Medicine & Surgery**. v.14, p. 1-14, 2008

HOOTON, T. M.; BESSER, R.; FOXMAN, B.; FRITSCH, T. R.; NICOLLE, L. E. Acute uncomplicated cystitis in an era of increasing antibiotic resistance: a proposed approach to empirical therapy. **Clinical Infectious Diseases**. v. 39, p. 75-80, 2004.

HOOTON, T. M. Uncomplicated urinary tract infection. **The New England Journal of Medicine**. v. 366, p. 1028-1037, 2012.

HORCAJADA, J. P.; SOTO, S.; GAJEWSKI, A.; SMITHSON, A.; ANTA, M. T. J.; MENSA, J.; VILA, J.; JOHNSON, J. R. Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 2962-2964, 2005.

HOUDOUIN, V.; BONACORSI, S.; MAHJOUR-MESSAI, F.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; BIDET, P.; SEBAG, G.; LOIRAT, C.; BOURRILLON, A.; BINGEN, E. Phylogenetic groups and virulence factors of *Escherichia coli* strains causing pyelonephritis in children with and without urinary tract abnormalities. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 13, p. 740-742, 2007.

JACOBSON, S. H.; HAMMARLIND, M.; LIDFELDT, K. J.; ÖSTERBERG, E.; TULLUS, K.; BRAUNER, A. Incidence of aerobactin-positive *Escherichia coli* strains in patients with symptomatic urinary tract infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 7, p. 630-634, 1988.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal of Infectious Disease**. v. 181, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, J. R. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 17, p. 261-272, 2003.

JØRGENSEN, M.; KELDING, N.; SKAKKEB K, N. E. Estimation of spermache from longitudinal spermaturia data. **Biometrics**. v. 47, p. 177-193, 1991.

KANAMARU, S.; KURAZONO, H.; NAKANO, M.; TERAJ, A.; OGAWA, O.; YAMAMOTO, S. Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: Comparison with phylogenetic groups. **International Journal of Urology**. v. 13, p. 754-760, 2006.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p. 123-140, 2004

KAWAMURA-SATO, K.; YOSHIDA, R.; SHIBAYAMA, K.; OHTA, M. Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance and phylogenetic background of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 63, p. 113-115, 2010.

LEYING, H.; SUERBAUM, S.; KROLL, H. P.; STAHL, D.; OPFERKUCH, W. The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v.58, p. 222-227, 1990.

LIANG, S. Y.; MACKOWIAK, P. A. Infections in the elderly. **Clinics in Geriatric Medicine**. v. 23, p. 441-456, 2007.

LUO, Y.; MA, Y.; ZHAO, Q.; WANG, L.; GUO, L.; YE, L.; ZHANG, Y.; YANG, J. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, p. 4002-4007, 2012.

MABBETT, A. N.; ULETT, G. C.; WATTS, R. E.; TREE, J. J.; TOTSIKA, M.; ONG, C.-L., Y.; WOOD, J. M.; MONAGHAN, W.; LOOKE, D. F.; NIMMO, G. R.; SVANBORG, C.; SCHAEMBRI, M. A. Virulence Properties of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**. v.299, p. 53-63, 2009

MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. JR. **Textbook of Diagnostic Microbiology**. cap. 31, p. 949-968, 1995.

MARKS, S. D.; GORDON, I.; TULLUS, K. Imaging in childhood urinary tract infections: time to reduce investigations. **Pediatric Nephrology**. v. 23, p. 9-17, 2008.

MARONCLE, N. M.; SIVICK, K. E.; BRADY, R. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 74, n. 11, p. 6124-6134, 2006.

MATSUMOTO, T. Urinary tract infections in the elderly. **Current Urology Reports**. v.2, p. 330-333, 2001.

MIDDENDORF, B.; HOCHHUT, B.; LEIPOLD, K. DOBRINDT, U.; BLUM-OEHLER, G.; HACKER, J. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. **Journal of Bacteriology**. v.186, p. 3086. 3096, 2004.

MIYAZAKI, J.; BA-THEIN, W.; KUMAO, T.; YASUOKA, M. O.; AKAZA, H.; HAYSHI, H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesion I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 33, p. 23-26, 2002.

MOLINA-LÓPEZ, J.; APARICIO-OZORES, G.; RIBAS-APARICIO, R. M.; GAVILANES-PARRA, S.; CHÁVEZ-BERROCAL, M. E.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; MANJARREZ-HERNÁNDEZ, H. A. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. **Journal of Infection in Developing Countries**. v. 5, n.12, p. 840-849, 2011.

MUHLDORFER, I.; HACKER, J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. **Microbial Pathogenesis**. v. 16, p. 171-181, 1994.

MUHLDORFER, I; ZIEBUHR, W.; HACKER, J. *Escherichia coli* in urinary tract infections. **Molecular Medical Microbiology**. p. 1515-1540, 2001.

MULLER, A. E.; OOSTVOGEL, P. M.; STEEGERS, E. A. P.; DÖRR, P. J. Morbidity related to maternal group B streptococcal infections. **Acta Obstetricia et Gynecologica**. v. 85, p. 1027-1037, 2006.

MULVEY, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**. v. 4, n. 5, p. 257-271, 2002.

NICOLLE, L. E. Urinary tract pathogens in complicated infection and in elderly individuals. **Journal of Infection Diseases**. v. 183, p. 5-8, 2001.

NORRBY, S. R. Short-term treat of uncomplicated lower urinary tract infections in women. **Reviews of Infection Diseases**. v. 12, p. 458-467, 1990.

OELSCHLAEGER, T. A.; DOBRINT, U.; HACKER, J. Virulence factors of uropathogens. **Current Opinion in Urology**. v. 12, p. 33-38, 2002.

OLIVEIRA, F. A.; PALUDO, K. S.; AREND, L. N. V. S.; FARAH, S. M. S. S.; PEDROSA, E. O.; SOUZA, E. M.; SUREK, M.; PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Genetics and Molecular Research**, v.11, 2011.

OLSVIK, O.; STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**, p.271-276, 1993.

PALACIOS, S.; HENDERSON, V. W.; SISELES, N.; TAN, D., VILLASECA, P. Age of menopause and impact of climacteric symptoms by geographical region. **Climateric**. v.13, p.419-428, 2010

PIATTI, G.; MANNINI, A.; BALISTRERI, M.; SCHITO, A. M. virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 480-487, 2008.

PICARD, B. et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 546-553, 1999.

RAGNARSDÓTTIR, B.; FISCHER, H.; GODALY, G.; RÖNBERGHERNANDEZ, J.; GUSTAFSSON, M.; KARPMAN, D.; LUNDSTEDT, A. C.; LUTAY, N.; RÄMISCH, S.; SVENSSON, M. L.; WULLT, B.; YADAV, M.; SVANBORG, C. TLR- and CXCR1-dependent innate immunity: insights into the genetics of

urinary tract infections. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 38, p. 12-20, 2008.

RONALD, A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. **The American Journal of Medicine**. v. 113, p. 14-19, 2002.

SABATÉ, M.; MORENO, E.; PÉREZ, T.; ANDREU, A.; PRATS, G. Pathogenicity island. Markers in comensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 12, p. 880-886, 2006.

SALVADOR, E.; WAGENLEHNER, F.; KÖHLER, C.-D.; MELLMANN, A.; HACKER, J.; SVANBORG, C.; DOBRINDT, U. Comparison of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* isolates from healthy individuals versus those from hospital patients shows that long-term bladder colonization selects for attenuated virulence phenotypes. **Infection and Immunity**. v. 80, p. 668-678, 2012.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis: a molecular approach**. 2.ed. ASM PRESS, Washington, Cap. 3, p. 30-46, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. New York: CSH, 1989.

SCHAEFFER, A. J. What do We about the urinary tract infection prone individual? **Journal of Infection Diseases**. v. 183, p. 66-69, 2001.

SHORTLIFFE, L. M. D. Urinary tract infection at the age extremes: pediatrics and geriatrics. **The American Journal of Medicine**. v. 113, p. 55-66, 2002.

SIMUNDIC, A. Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in Biochemia Medica Journal. **Biochemia Medica Journal**. v.22, p. 15-23, 2012.

SKJ T-RASMUSSEN, L.; EJRN S, K.; LUNDGREN, B.; HAMMERUM, A. M.; FRIMODT-M LLER, N. Virulence factors and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from patients with bacteraemia of urinary tract origin relate to sex and hospital vs. community-acquired origin. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 302, p. 129-134, 2012.

SLAVCHEV, G. et al. Virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Culture Collections**. v.6, p. 3-9, 2009.

SOTO, S. M.; JIMENEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or independent pathways, respectively. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, p. 649-653, 2006.

STAMM, W.E. Host-pathogen interactions in community acquired urinary tract infections. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**. v. 117, p. 75-84, 2006.

STAPLETON, A. Urinary tract infections in patients with diabetes. **The American Journal of Medicine**. v. 113, p. 80-84, 2002.

SUKUPOLVI, S.; O'CONNOR, C. D. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between Gram-negative bacteria and their environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 331-341, 1990.

SVANBORG, E. C.; GODALY, G. Bacterial virulence in urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics North America**. v. 11, p. 513-529, 1997.

SVANBORG, C.; SCHEMBRI, M. A. Virulence properties of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 299, p. 53-63, 2009.

TAKAHASHI, A.; KANAMARU, S.; KURAZONO, H.; KUNISHIMA, Y.; TSUKAMOTO, O.O.; YAMAMOTO, S. *Escherichia coli* isolates associated with uncomplicated and complicated cystitis and asymptomatic bacteriuria possess similar phylogenies, virulence genes and O-serogroup profiles. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 4589-4592, 2006.

TAVARES, C. H. F.; HAEFFNER, L. S. B.; BARBIERI, M. A.; BETTIOL, H.; BARBIERI, M. R.; SOUZA, L. Idade da menarca em escolares de uma comunidade rural do sudeste do brasil. **Caderno de Saúde Publica**. v.16, n. 3, p.709-715, 2000.

TI, T. Y.; KUMARASINGHE, G.; TAYLOR, M. B.; TAN, S. L.; EE, A.; CHUA, C.; LOW, A. What is true community-acquired urinary tract infection? Comparison of pathogens identified in urine from routine outpatient specimens and from community clinics in a prospective study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 22, p. 242-245, 2003.

ULLETT, K. B.; BENJAMIN JR, W. H.; ZHUO, F.; XIAO, M.; KONG, F.; GILBERT, G. L.; SCHEMBRI, M. A., ULLETT, G. C. Diversity of group B *Streptococcus* serotypes causing urinary tract infections in adults. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 7, p.2055-2060, 2009.

ULLERYD, P.; ZACKRISSON, B.; AUS, G.; BERGDAHL, S.; HUGOSSON, J.; SANDBERG, T. Selective urological evaluation in men with febrile urinary tract infection. **British Journal of Urology International**. v. 88, p. 15-20, 2001.

VARLI, M.; GURUZ, H.; ARAS, S.; YALCIN, A.; ATLI, T.; TURGAY, M. Asymptomatic bacteriuria among the elderly living in the community: prevalence, risk factors and characteristics. **European Geriatric Medicine**. v. 3, p. 87-91, 2012.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**. v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; VAUGAN, E. D.; WEIN, A. J. **Campbell's Urology**. 8 ed., v. 1, p. 513-590, 2002.

WAGENLEHNER, F. M.; NABER, K. G. New gram-positive uropathogens. **International Journal Antimicrobial Agents**. v. 24, p. 39-43, 2004.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 85, p. 11-19, 2008.

WINN, H. N. Group B *Streptococcus* infection in pregnancy. **Clinics in Perinatology**. v.34, p.387-392, 2007.

WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRENCKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6a. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

WILSON, M. L.; GAIDO, L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38, p.1150. 82004, 2004.

YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; YURI, K.; KURAZONO, H. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 12, p. 85-90, 1995.

YIN, X.; HOU, T.; LIU, Y.; CHEN, J.; YAO, Z.; MA, C.; YANG, L.; WEI, L. Association of toll-like receptor 4 gene polymorphism and expression with urinary tract infection types in adults. **PLoS ONE**. v. 5, 2010.

ZHANG, L.; FOXMAN, B.; MANNING, S. D.; TALLMAN, P.; MARRS, C. F. Molecular epidemiologic approaches to urinary tract infection gene discovery in uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2009-2015, 2000.

ZHAO, L.; CHEN, X.; ZHU, X.; YANG, W.; DONG, L.; XU, X.; GAO, S.; LIU, X. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). **Journal of Urology**. v. 74, n. 3, p. 702-707, 2009.

ZORC, L.; FOXMAN, B. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. **Frontiers in Bioscience**. v. 8, p. 235-244, 2005.