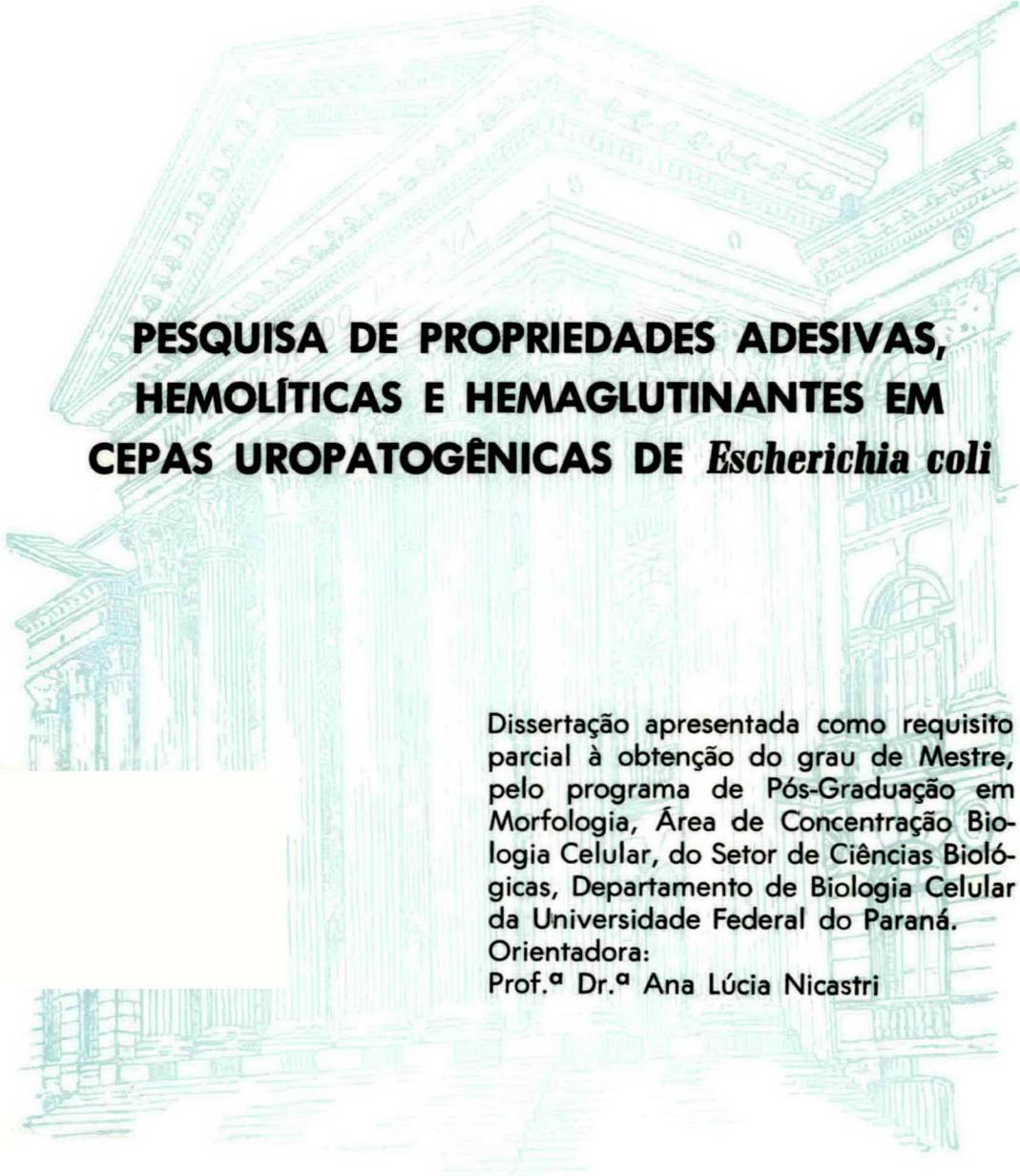


ROSÁLIA RUBEL



**PESQUISA DE PROPRIEDADES ADESIVAS,
HEMOLÍTIICAS E HEMAGLUTINANTES EM
CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *Escherichia coli***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Morfologia, Área de Concentração Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

Prof.^ª Dr.^ª Ana Lúcia Nicastri

CURITIBA

2001

ROSÁLIA RUBEL

**PESQUISA DE PROPRIEDADES ADESIVAS, HEMOLÍTICAS E
HEMAGLUTINANTES EM CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *Escherichia coli***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Morfologia - Área de Concentração Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia
Nicastri

CURITIBA

2001

RUBEL, R.

Rubel, Rosália.

Pesquisa de propriedades adesivas, hemolíticas e hemaglutinantes em cepas uropatogênicas de *Escherichia coli* / Rosália Rubel. – Curitiba, 2001.

101f.:il.

Orientador: Ana Lúcia Nicastri.

Dissertação (mestrado em morfologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli*. I. Nicastri, Ana Lúcia. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. III. Título

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

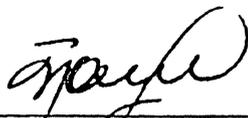
PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "PESQUISA DE PROPRIEDADES ADESIVAS, HEMOLÍTICAS E HEMAGLUTINANTES EM CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *Escherichia coli*", de autoria da Pós-Graduanda Rosália Rubel, e composta pelos Professores: Dra. Ana Lucia Nicastrí; (como Orientadora e Presidente); Dr. Tomomasa Yano (UNICAMP); e Dr. João Caetano Fortes (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dra. Ana Lúcia Nicastrí, nota dez (10,00); Dr. Tomomasa Yano, nota dez (10,0); e Dr. João Caetano Fortes, nota dez (10,0). De acordo com o Regimento interno do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: aprovada com a nota dez (10,0), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas.

Em Curitiba, 12 de dezembro de 2001.



Dra. Ana Lúcia Nicastrí



Dr. Tomomasa Yano



Dr. João Caetano Fortes

Agradeço a Deus pelo dom da vida.
Agradeço aos meus pais, Marcelino e Tullia, por terem me transmitido a vida.
À memória de meu pai que me transmitiu o gosto pelo saber e que sempre
compartilhou generosamente a sua sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Sem a ajuda de diversas pessoas e entidades não seria possível a concretização deste trabalho. Expresso a todos os meus sinceros agradecimentos. O receio de esquecer nomes me levou a não nomeá-los integralmente. Peço desculpas e compreensão a esses valiosos companheiros de jornada.

À Universidade Federal do Paraná, que apesar de tantos problemas enfrentados, vem cumprindo a sua missão de garantir aos cidadãos ensino gratuito e de qualidade.

Agradeço a amizade e a orientação da Prof.^a Ana Lúcia Nicastrí, especialmente, por ter acreditado em minha proposta de trabalho e me aceitado como orientanda.

Ao Prof. Ciro A. de O. Ribeiro, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, sempre atencioso e dedicado. Expresso a minha gratidão a todo o corpo docente, pelo exemplo de dedicação que me transmitiram. Aos colegas de curso e aos profissionais das áreas técnica e administrativa pela amizade e auxílio.

Aos colegas do Laboratório do Hospital de Clínicas, em cujas dependências este trabalho foi realizado. Em especial agradeço às seções de Virologia, de Bacteriologia, de Micologia, à Central de Soluções e à Central de Esterilização de Materiais.

Ao Prof. Tomomasa Yano do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, pela gentileza de ter enviado as cepas bacterianas para controle das reações.

À irmã e Prof.^a Ângela Maria Rubel Fanini, por me auxiliar em tantas dúvidas de redação.

À Dr.^a Lúcia Noronha do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas, pela gentileza de permitir o uso do fotomicroscópio.

Ao Prof. James Joseph Roper, pela disponibilidade em avaliar a possibilidade de cálculos estatísticos neste trabalho.

À ULTRALAB – Produtos para Laboratório, Curitiba-PR, representada por seu proprietário Sr. José Antônio Guerreiro, pela valiosa contribuição com material para o cultivo celular.

À CULTILAB – Campinas-SP, pela generosidade demonstrada ao fornecer meio de cultivo celular.

Ao Lacen (Laboratório Central do Estado) e ao Hemeper (Hemocentro do Estado do Paraná) pela gentileza de me fornecerem reagentes para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO.....	5
3.2 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO: FATORES PREDISPO-NENTES E EPIDEMIOLOGIA.....	7
3.3 <i>Escherichia coli</i>	11
3.4 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE BACTERIANA.....	12
3.5 RELEVÂNCIA DO PROCESSO DE ADESÃO BACTERIANA.....	12
3.6 PILI OU FÍMBRIA.....	15
3.7 HEMAGLUTININAS E ADESÃO BACTERIANA.....	16
3.8 FÍMBRIA TIPO 1.....	19
3.8.1 Receptores e Expressão da Fímbria Tipo 1.....	20
3.8.2 Papel da Fímbria Tipo 1 na Patogênese das Infecções do Trato Urinário ...	21
3.9 FÍMBRIA TIPO II OU FÍMBRIA P.....	23
3.9.1 Receptores e Expressão da Fímbria P.....	26
3.9.2 Papel da Fímbria P em Infecções do Trato Urinário.....	27
3.10 ADESINAS MANOSE-RESISTENTES NÃO FÍMBRIA P.....	28
3.10.1 Fímbria S.....	29
3.10.2 Adesinas da Família Dr.....	29
3.11 EXPRESSÃO SIMULTÂNEA DE ADESINAS MS E MR EM CEPAS DE <i>E. coli</i> UROPATOGÊNICAS.....	30
3.12 MÉTODOS DE PESQUISA DE ADESINAS BACTERIANAS.....	31
3.12.1 Aderência a Células Epiteliais.....	31
3.12.2 Hemaglutinação e Aglutinação com Partículas de Látex.....	32
3.13 RECEPTORES ESPECÍFICOS PARA HEMAGLUTININAS BACTERIANAS.....	33
3.14 OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>E. coli</i> UROPATOGÊNICA..	35
3.14.1 Produção de Hemolisina.....	36

3.14.2 Antígenos Estruturais em Cepas de <i>E. coli</i>	37
3.15 PROFILAXIA ANTIMICROBIANA E INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO	38
3.16 PERSPECTIVAS EM IMUNOTERAPIA PARA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>E. coli</i>	43
4.2 REGISTRO DE DADOS.....	44
4.3 MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>E. coli</i>	44
4.4 PESQUISA DE HEMAGLUTININAS MANOSE-RESISTENTES E MANOSE-SENSÍVEIS	45
4.4.1 Suspensão Bacteriana	45
4.4.2 Suspensão de Eritrócitos	46
4.4.3 Detecção de Hemaglutinação Manose-resistente.....	47
4.4.4 Detecção de Hemaglutinação Manose-sensível.....	48
4.5 DETECÇÃO DE HEMOLISINAS	49
4.6 PESQUISA DE ADERÊNCIA BACTERIANA A CÉLULAS HEP-2.....	50
4.6.1 Manutenção da Linhagem Celular	50
4.6.2 Preparo das Monocamadas Celulares.....	52
4.6.3 Preparo das Suspensões Bacterianas para o Teste de Aderência.....	53
4.6.4 Período de Infecção das Monocamadas Celulares	54
5 RESULTADOS.....	56
5.1 PESQUISA DE HEMAGLUTININAS.....	56
5.2 PESQUISA DE HEMOLISINAS	58
5.3 TESTE DE ADESÃO BACTERIANA A CÉLULAS HEP-2	59
5.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CEPAS BACTERIANAS	61
6 DISCUSSÃO.....	80
6.1 QUANTO À HEMAGLUTINAÇÃO	80
6.2 QUANTO À HEMÓLISE	83
6.3 QUANTO À ADESÃO BACTERIANA A CÉLULAS EPITELIAIS.....	85
6.4 QUANTO ÀS CARACTERÍSTICAS DO HOSPEDEIRO	89
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-RECEPTORES ESPECÍFICOS PARA ADESINAS BACTERIANAS..	34
TABELA 2	-IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR ESPECÍFICO PARA ADESINA MANOSE-RESISTENTE.....	35
TABELA 3	-EXPRESSÃO FENOTÍPICA <i>IN VITRO</i> DE HEMAGLUTININAS MANOSE-RESISTENTES E MANOSE-SENSÍVEIS EM CEPAS UROPATOGÊNICAS DE <i>E. coli</i>	57
TABELA 4	-FATORES DE VIRULÊNCIA (HEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-RESISTENTE, HEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-SENSÍVEL E HEMÓLISE) EM 30 CEPAS DE <i>E. coli</i>	58
TABELA 5	-EFEITO DA DENSIDADE DO INÓCULO BACTERIANO E DO TEMPO DE INFECÇÃO SOBRE A CAPACIDADE ADESIVA DE CEPAS UROPATOGÊNICAS DE <i>E. coli</i>	60
TABELA 6	-CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE 30 CEPAS UROPATOGÊNICAS DE <i>E. coli</i> QUANTO À EXPRESSÃO DE HEMAGLUTININAS, ADESINAS E HEMOLISINAS E PERFIL DOS PACIENTES EM RELAÇÃO A SEXO, IDADE E INDICAÇÃO CLÍNICA.....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1-	DISTRIBUIÇÃO DE HEMAGLUTININAS MR E MS EM 30 CEPAS UROPATOGÊNICAS DE <i>E. coli</i>	63
GRÁFICO 2-	ASSOCIAÇÃO ENTRE HEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-SENSÍVEL (MS) E PRODUÇÃO DE HEMOLISINAS (Hly) EM 21 CEPAS UROPATOGÊNICAS DE <i>E. coli</i>	64
FIGURA 1-	AGLUTINAÇÃO DE CEPA DE <i>E. coli</i> COM ERITRÓCITOS HUMANOS.....	65
FIGURA 2 -	AGLUTINAÇÃO DE CEPA DE <i>E. coli</i> COM <i>S. cerevisiae</i>	66
FIGURA 3 -	DETALHE DA INTERAÇÃO ENTRE CEPA DE <i>E. coli</i> E <i>S. cerevisiae</i>	67
FIGURA 4 -	REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO NEGATIVA ENTRE CEPA DE <i>E. coli</i> E <i>S. cerevisiae</i>	68
FIGURA 5 -	<i>E. coli</i> CULTIVADA EM ÁGAR-SANGUE APRESENTANDO REAÇÃO NÃO HEMOLÍTICA E HEMOLÍTICA.....	69
FIGURA 6 -	ADERÊNCIA DIFUSA DE <i>E. coli</i> UROPATOGÊNICA EM CÉLULAS HEp-2.....	70
FIGURA 7 -	ADERÊNCIA EM AGRUPAMENTOS LOCALIZADOS DE <i>E. coli</i> UROPATOGÊNICA EM CÉLULAS Hep-2.....	71
FIGURA 8 -	<i>E. coli</i> UROPATOGÊNICA FORMANDO UM AGRUPAMENTO LOCALIZADO EM CÉLULAS HEp-2.....	72
FIGURA 9 -	<i>E. coli</i> UROPATOGÊNICA FORMANDO DOIS AGRUPAMENTOS LOCALIZADOS EM CÉLULAS HEp-2.....	73
FIGURA 10 -	<i>E. coli</i> UROPATOGÊNICA ADERINDO EM FORMA DE AGREGADOS A CÉLULAS HEp-2.....	74

FIGURA 11 - CÉLULA DA LINHAGEM HEp-2 INFECTADA COM <i>E. coli</i> UROPATOGÊNICA E APRESENTANDO VACÚOLOS CITOPLASMÁTICOS.....	75
FIGURA 12 - EFEITO CITOTÓXICO DE CEPA DE <i>E. coli</i> HEMOLÍTICA EM CÉLULAS HEp-2.....	76
FIGURA 13 - MONOCAMADA SEMICONFLUENTE DE CÉLULAS HEp-2.....	77
FIGURA 14 - ADESÃO DE CEPA DE <i>E. coli</i> A CÉLULAS HEp-2 NA PRESENÇA DE D-MANOSE.....	78
FIGURA 15 - ADESÃO EM AGREGADOS DE CEPA DE <i>E. coli</i> A CÉLULAS HEp-2, NA PRESENÇA DE D-MANOSE.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	- Ácido desoxirribonucléico
BGN	- Bacilos Gram-negativos
BHI	- Infusão de cérebro e coração de boi
CFA	- Fator adesivo de colonização
CGP	- Cocos Gram-positivos
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLED	- Cistina-lactose eletrólito deficiente
CNF	- Fator necrotizante citotóxico
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DAEC	- <i>E. coli</i> com aderência difusa
EAF	- Fator aderente de EPEC
EaggEC	- <i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	- <i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	- <i>E. coli</i> enteroinvasora
EPEC	- <i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	- <i>E. coli</i> enterotoxigênica
Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β	- α - D - galactopiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D - galactopiranosídeo
GAG	- Glicosaminoglicano
HÁ	- Hemaglutinação
HEp-2	- Linhagem de epitélio humano

Hemepar	- Hemocentro do Estado do Paraná
Kda	- quiloDalton
MEM	- Meio essencial mínimo
MH	- Mueller-Hinton
MS	- Manose-sensível
MSHA	- Hemaglutinação manose-sensível
MR	- Manose-resistente
MRHA	- Hemaglutinação manose-resistente
MRMS	- Manose-resistente e Manose-sensível
NCCLS	- Comitê Nacional de Padronização para Laboratórios Clínicos
P	- Eritrócitos humanos grupo sanguíneo P
P ₁	- Eritrócitos humanos grupo sanguíneo P ₁
p	- Eritrócitos humanos não pertencentes ao grupo sanguíneo P
PAI	- Ilhas associadas à patogenicidade
Pap	- Pili associado à pielonefrite
PBS	- Tampão fosfato em solução salina
pH	- Potencial hidrogeniônico
TSA	- Ágar soja tripticaseína
TSB	- Caldo de soja tripticaseína
UFC	- Unidades formadoras de colônia

RESUMO

Foram analisadas 30 cepas uropatogênicas de *Escherichia coli* quanto à expressão de três fatores de virulência: hemaglutinação, adesão a células epiteliais e produção de hemolisina. A pesquisa de hemaglutininas revelou a seguinte expressão fenotípica entre os isolados clínicos: 40% aglutinaram eritrócitos de cobaia na ausência de D-manose (cepas manose-sensíveis - MS); 13,3% aglutinaram eritrócitos humanos na presença de D-manose (cepas manose-resistentes - MR); 30% das cepas apresentaram os dois padrões de hemaglutinação (cepas MRMS) e 16,6% das cepas não expressaram as hemaglutininas pesquisadas. A presença de hemolisina ocorreu em 26,6% das cepas e sempre foi acompanhada da expressão de hemaglutininas MS. As cepas com fenótipo hemaglutinante MRMS e hemolíticas provocaram descolamento das monocamadas de células HEp-2 das lamínulas. Todas as cepas com hemaglutininas MR aderiram à linhagem celular, enquanto que as cepas somente com hemaglutininas MS aderiram em menor grau e as cepas não hemaglutinantes praticamente não aderiram. Os resultados confirmam a hemaglutinação como fator de virulência bacteriana e a relação direta entre hemaglutinação manose-resistente e capacidade adesiva. As cepas que não expressaram hemaglutininas e adesinas também não se apresentaram hemolíticas. Esses dados sugerem a interferência de outros fatores de virulência, não contemplados nesta pesquisa, atuando no potencial patogênico dessas cepas.

Palavras-chave: Infecção urinária, adesão bacteriana, *Escherichia coli* uropatogênica.

ABSTRACT

Thirty uropathogenic strains of *Escherichia coli* were analyzed regarding the expression of virulence factors: hemagglutination, adhesion to epithelial cells and production of hemolysin. The analysis of hemagglutinins revealed the following phenotypical expression between the clinical isolates: 40% agglutinated red blood cells of guinea pigs in the absence of D-mannose (mannose - sensitive strains – MS); 13.3% agglutinated human red blood cells in the presence of D-mannose (mannose-resistant strains – MR); 30% of the strains showed the two hemagglutinin patterns (MRMS strains) and 16.6% of the strains did not express the hemagglutinins that were studied. The presence of hemolysin occurred in 26.6% of the strains and was always accompanied by the expression of MS hemagglutinins. The strains with a MRMS hemagglutinating phenotype that were also hemolytic caused detachment of HEp-2 cell monolayers from glass coverslips. All the strains with MR hemagglutinin adhered to the cell lineage, while the strains only with MS hemagglutinin were less adherents and the non-agglutinating strains did not adhere at all. The results confirm hemagglutination as a bacterial virulence factor and the direct relationship between mannose-resistant hemagglutination and adhesive ability. The strains that did not express hemagglutinins and adhesins did not prove to be hemolytic either. These data suggest the interference of other virulence factors, not focused in this research work, acting on the pathogenic potential of these strains.

Key words: Urinary infection, bacterial adhesion, uropathogenic *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

Os acometimentos clínicos caracterizados por infecção do trato urinário englobam a presença de microrganismos em estruturas do trato urinário, estendendo-se desde os rins até o meato uretral. As anormalidades podem variar desde a simples colonização da urina por bactérias, caracterizando o quadro de bacteriúria assintomática, ou a ocorrência de cistites nas quais infecções sintomáticas comprometem a bexiga, ou infecções renais configurando a pielonefrite (KUNIM, 1991).

As infecções do trato urinário estão entre as doenças de origem infecciosa mais comuns, acometendo milhões de pessoas anualmente e causando considerável morbidade e mortalidade. Evidências epidemiológicas apontam a bactéria *Escherichia coli* como o principal agente etiológico dessas infecções (WARREN, 1996).

O trato urinário é estéril acima do nível uretral. A resistência do hospedeiro à bacteriúria tem sido atribuída ao mecanismo de fluxo urinário e às defesas imunológicas inespecíficas. Os processos infecciosos são deflagrados quando a bactéria é capaz de vencer esses mecanismos de defesa e ascender via uretral. Assim, a migração bacteriana para o interior do trato urinário requer aderência eficaz ao uroepitélio para que haja resistência às correntes do fluxo urinário (EDÉN, 1986). O revestimento da vagina e uretra é constituído de tecido epitelial estratificado escamoso. O epitélio da uretra proximal, bexiga, ureteres e pélvis renal é considerado transicional, ou seja, o número de camadas celulares e o formato variam com a distensão. Em contraste, o epitélio dos túbulos renais é composto por uma única camada formada por células altamente especializadas, que apresentam mecanismos de transporte eficazes: secretam ativamente e absorvem água, íons e outras substâncias da urina. Essas variações estruturais de superfície resultam em diferenças de pH, osmolaridade e pressão dentro de um mesmo ambiente anatômico. Para que ocorra a

colonização desse epitélio complexo é necessário haver especificidade nas ligações de moléculas adesivas bacterianas a receptores de superfície das células uroepiteliais (DONNENBERG; WELCH, 1996).

Dentre os fatores de virulência bacterianos, a adesão é o fenômeno que apresenta a melhor associação com a patogenicidade *in vivo*. Dessa forma, constitui o primeiro passo e o mais importante no estabelecimento do processo infeccioso nas superfícies mucosas. Desde que aderidas, as bactérias podem crescer, reproduzir e formar uma massa capaz de expressar outras proteínas, como toxinas e hemolisinas, em níveis que garantam o seu estabelecimento no organismo do hospedeiro (ROBERTS, 1987; BROGDEN, 1995).

Ensaio de adesão *in vitro*, que estabelecem contato da bactéria com células epiteliais de mamíferos, indicam uma forte correlação entre aderência e a severidade da infecção urinária. As cepas de *E. coli*, isoladas a partir de casos de pielonefrite aguda, demonstram uma maior taxa de adesão quando comparadas com espécimes isolados de bacteriúria assintomática ou cepas pertencentes à microbiota intestinal (EDÉN, 1986). Ainda não se sabe claramente o que leva uma bactéria da microbiota normal expressar mecanismos de virulência que a transforme em cepa patogênica.

A literatura referente à adesão bacteriana usa de forma intercambiável o termo pili, pilus ou fimbria para designar os apêndices bacterianos de superfície usados para a aderência a receptores das células do hospedeiro. Segundo TORTORA, FUNKE e CASE (1995), o pili está associado ao fenômeno de conjugação bacteriana, enquanto que a fimbria atua no processo de adesão. Porém, as fimbrias não são o único modo de ligação, já que a bactéria pode apresentar moléculas adesivas sobre toda a sua superfície, incluindo membrana externa ou material capsular (BROGDEN, 1995). Este trabalho se referirá a pili, pilus ou fimbria considerando-as como estruturas similares.

Estudos de DUGUID, CLEGG e WILSON (1979) permitem identificar nas cepas de *E. coli* dois tipos principais de hemaglutininas fimbriais: 1- a hemaglutinina manose-sensível (MS) associada à fimbria tipo 1 e cuja hemaglutinação (HA) a eritrócitos de cobaia é inibida por D-manose; 2- a hemaglutinina manose-resistente

(MR) insensível à ação da D-manose e associada à fimbria P. A denominação de fimbria P deve-se à sua associação com pielonefrite aguda em humanos e ao fato de ter especificidade para receptores presentes em glicosfingolipídeos de antígenos do grupo sanguíneo P (ROBERTS et al., 1994; SVANBORG; GODALY, 1997).

Além da fimbria P, outras adesinas podem conferir hemaglutinação manose-resistente, porém, a epidemiologia de infecções urinárias causadas por cepas de *E. coli* produtoras dessas adesinas, ainda não está totalmente esclarecida (DONNENBERG; WELCH, 1996).

PARRY et al. (1983) relacionam a severidade da infecção urinária com hemaglutinação manose-resistente (MRHA) na seguinte ordem: pielonefrite, cistite e bacteriúria assintomática. A ordem inversa foi observada em cepas apresentando hemaglutinação manose-sensível (MSHA) ou em cepas não aglutinantes.

A hemolisina produzida por cepas de *E. coli* consiste em uma toxina citolítica que atua na membrana celular dos eritrócitos gerando lesões que levam à lise celular. Entretanto, a ação sobre células nucleadas ainda não foi investigada (MOAYERI; WELCH, 1994). Vários trabalhos têm relacionado a produção de hemolisina com o potencial de virulência de cepas de *E. coli* uropatogênicas (GREEM; THOMAS, 1981; IKAHEIMO et al., 1993; IKAHEIMO et al., 1994).

Além das propriedades adesivas, hemolíticas e hemaglutinantes, várias outras podem contribuir para o potencial patogênico das cepas uropatogênicas de *E. coli*. Porém, TULLUS et al. (1991) ao analisarem a importância de oito fatores de virulência em cepas de *E. coli* pielonefritogênicas, observaram que somente esses três (hemaglutinação, adesão e hemólise) estão estatisticamente associados com virulência.

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Experimentos *in vitro* evidenciam que é possível evitar a colonização das superfícies mucosas através da exposição prévia, das bactérias a concentrações subletais de agentes antimicrobianos. Na prática, esses dados teóricos constituem a base dos regimes profiláticos de baixas doses terapêuticas utilizadas na prevenção das infecções urinárias em pacientes de risco (gestantes, imunossuprimidos). Porém, a principal contra-indicação da profilaxia antimicrobiana é que seu uso prolongado pode vir a selecionar mutantes resistentes aos antibióticos empregados. As pesquisas que investigam a imunoterapia como instrumento para a prevenção de infecções urinárias ainda não apresentam dados conclusivos quanto à ação de vacinas direcionadas contra moléculas adesivas da *E. coli* sobre a microbiota intestinal. Da mesma forma, faltam experimentos clínicos que garantam a eficácia e a segurança desses imunoterápicos (SERVICE, 1997; JIAN; FUSCO, 2000).

Atualmente as pesquisas, nessa área do conhecimento, estão direcionadas para o estudo dos diferentes mecanismos de virulência dos microrganismos, prevendo-se que, dessa forma, obter-se-ão bases seguras para o desenvolvimento de uma terapia racional na prevenção e tratamento das infecções urinárias.

Portanto, este trabalho tem por objetivo selecionar 30 cepas uropatogênicas de *E. coli* da urina de pacientes do Hospital de Clínicas (UFPR) e pesquisar, nessas cepas, a expressão dos seguintes fatores de virulência: hemaglutinação, adesão celular e produção de hemolisinas. A análise subsequente dos dados obtidos tentará relacionar a expressão desses fatores de virulência entre si e com as condições experimentais empregadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

O trato urinário é dividido em duas regiões: 1- superior, que compreende rins, pelve renal e ureteres; 2- inferior, que corresponde à bexiga e uretra. As infecções do trato urinário são geralmente ascendentes, isto é, os microrganismos da área periuretral ascendem através da uretra até a bexiga e via ureteres podem alcançar os rins. Embora menos comuns, as infecções do trato urinário superior podem originar-se por via hematogênica em pacientes com septicemia. As características anatômicas do trato urinário tornam-no suscetível a colonizações e infecções por microrganismos exógenos. Segundo estatísticas americanas, as infecções do trato urinário estão entre as infecções bacterianas mais comuns, perdendo apenas para as infecções do trato respiratório. A admissão em hospitais, na maioria das vezes por pielonefrite aguda, é estimada em cerca de 100.000 casos por ano nos Estados Unidos. As infecções urinárias constituem a fonte mais comum de bacteriemia (KUNIN, 1991; WARREN, 1996). Estima-se que a incidência anual de cistite em mulheres americanas seja de 0,5 a 0,7 episódios por ano, sendo que cerca de 25% dessas pacientes podem desenvolver infecções recorrentes (STAPLETON, 1999).

Embora as estatísticas brasileiras em relação a infecções do trato urinário, careçam de dados mais abrangentes, é plausível que esse problema seja agravado devido às condições precárias de nossa população, em relação à saúde e higiene, constituindo um custo substancial para a sociedade.

As infecções do trato urinário se manifestam principalmente sob três entidades clínicas: cistite, pielonefrite e bacteriúria assintomática. A cistite é uma infecção restrita à bexiga e caracterizada por disúria (dor ao urinar), urgência e frequência urinária, causando às vezes desconforto na forma de dor suprapúbica. A pielonefrite refere-se à inflamação dos rins e estruturas adjacentes (pelve renal), sendo que

nenhum agente específico é apontado como responsável nessa definição ampla. A pielonefrite bacteriana aguda constitui uma síndrome clínica caracterizada por febre, dor lombar, mal-estar geral frequentemente acompanhado de náuseas, vômitos e fadiga. Os sintomas de cistite podem ou não estar presentes na pielonefrite. A pielonefrite bacteriana crônica é o termo usado para designar a presença de infecções de longa duração com crescimento bacteriano ativo ou de lesão residual produzida no passado mas inativa no momento. Níveis elevados de proteína C-reativa, altas taxas de sedimentação eritrocitária, diminuição da função de concentração renal, leucocitose, leucocitúria (leucócitos na urina) e bacteriúria (bactérias na urina) são achados laboratoriais que podem estar presentes nos casos de pielonefrite em graus variáveis de acordo com a complexidade e forma da lesão. A bacteriúria assintomática é comumente detectada apenas ao nível laboratorial e sempre tem o potencial de emergir como infecção sintomática (KUNIN, 1991; WARREN, 1996).

A maioria dos casos de infecção do trato urinário ocorre em pacientes hígidos, sem lesões no trato urinário nem doenças sistêmicas predisponentes. Nesse caso, a infecção é denominada descomplicada e tem como agente etiológico, predominantemente, a bactéria *E. coli*. Por outro lado, as infecções complicadas ocorrem, em geral, em dois grupos de pacientes. O primeiro grupo compreende aqueles que albergam corpos estranhos no trato urinário (próteses ou rim transplantado), indivíduos com defeitos anatômicos no trato urinário (refluxo vesicoureteral e obstruções) e pacientes submetidos à instrumentalização. O segundo grupo inclui hospedeiros suscetíveis a infecções como os imunossuprimidos de forma geral (WARREN, 1996).

A infecção urinária complicada tem as seguintes características: pode ser causada por um amplo espectro de microrganismos, a resposta à antibioticoterapia é menos preditiva e, geralmente, ocorrem reincidivas com o mesmo microrganismo. As cepas de *E. coli* são isoladas com menor frequência em infecções urinárias complicadas e apresentam-se expressando menos fatores de virulência quando comparadas com cepas isoladas de infecções urinárias descomplicadas. Esse comportamento deve-se, provavelmente, às condições do hospedeiro que dispensam a

presença de mecanismos especiais de virulência nas cepas bacterianas infectantes (RUBIN; RUBIN, 1997).

A urina é um ultrafiltrado estéril do sangue que, na ausência de infecções urinárias, origina-se a partir dos rins e bexiga livres de microrganismos. Durante a passagem pela uretra, um pequeno número de bactérias pertencentes à microbiota local pode ser carregado pelo fluxo urinário e contaminá-la. Para se distinguir entre a simples presença de contaminantes de uma “bacteriúria significativa”, composta por microrganismos que estão realmente se multiplicando na urina e são provenientes de tecidos infectados, há necessidade de se proceder a culturas quantitativas de urina. Quando esse procedimento é realizado, a urina normal não apresenta bactérias ou, no máximo, um nível de contaminação de 10.000 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Porém, a cultura de urina proveniente de paciente no qual as bactérias estão se multiplicando na bexiga apresenta cifras iguais ou superiores a 100.000 UFC/mL. O conceito de “bacteriúria significativa” associado a contagens de 10^5 UFC/mL ou mais não é absoluto uma vez que contagens menores, entre a faixa de 10^3 a 10^5 UFC/mL, também podem ser obtidas a partir da urina de pacientes infectados. Há vários fatores que afetam o crescimento bacteriano na urina, como a diferença nas taxas de replicação de cada espécie bacteriana; variações no fluxo, no pH e na composição química da urina; tempo de incubação do microrganismo na bexiga; ou o uso de agentes antimicrobianos que podem suprimir o crescimento bacteriano (KUNIN, 1991).

3.2 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO: FATORES PREDISPONENTES E EPIDEMIOLOGIA

A epidemiologia das infecções do trato urinário pode ser analisada sob diferentes ângulos: microrganismos prevalentes, natureza do hospedeiro conforme o sexo, a idade, os fatores de risco, atividade sexual e estado de secretor dos grupos sanguíneos A, B, H e de Lewis.

Em relação ao agente etiológico, dados epidemiológicos apontam os bacilos

Gram-negativos (BGN) pertencentes à família *Enterobacteriaceae* como os principais causadores de infecções do trato urinário. Entre os gêneros dessa família, a *E. coli* é o microrganismo mais isolado de urina de pacientes portadores dessas infecções, correspondendo a 80% dos casos de infecções urinárias descomplicadas, e com taxas de recuperação em cistite feminina de 75 a 80%. Outras enterobactérias que também são isoladas em culturas de urina, porém, menos freqüentemente, são a *Klebsiella pneumoniae* e o *Proteus mirabilis*. Entre os cocos Gram-positivos (CGP), o *Staphylococcus saprophyticus* é o segundo germe isolado de infecções urinárias descomplicadas em mulheres jovens, embora apareça muito atrás da *E. coli*. Em infecções urinárias complicadas, a incidência de *E. coli* é menos proeminente, sendo isolados outros organismos Gram-negativos entre os quais encontram-se: *Enterobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Providencia* sp e *Morganella* sp, além de organismos Gram-positivos como *Enterococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Staphylococcus aureus* e leveduras, particularmente *Candida* sp (WARREN, 1996).

A proporção entre indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino para infecções sintomáticas do trato urinário é de 2,5:1 no primeiro mês de vida e gradualmente muda para 1:30 na idade de 10 anos. Dentro de um ano, a partir da infecção inicial, a recorrência ocorre em cerca de 25% dos meninos e 40% das meninas. Múltiplas recorrências são mais comuns em meninas e estão associadas ao incremento na colonização periuretral por bactérias fecais como a *E. coli*, ou de bactérias da microbiota da pele como o *S. saprophyticus*. São observadas cicatrizes renais em cerca de um terço das crianças com pielonefrite aguda, fato que as torna grupo de risco, quando adultas, para hipertensão, disfunção e falha renal. Epidemiologicamente, essas cicatrizes podem estar associadas com refluxo vesicoureteral, condição que permite o refluxo da urina para um ou ambos os rins (WARREN, 1996). Entre adultos saudáveis e com trato urinário normal, as mulheres representam 90% dos pacientes com infecções do trato urinário e, dessas, 95% desenvolvem sintomas de cistite. A incidência de cistite em mulheres começa na puberdade e continua na idade adulta, de forma que é estimado um valor em torno de 40% de mulheres que apresentarão um episódio de cistite durante suas vidas. Após o

primeiro episódio cerca de 30% das mulheres terão infecções recorrentes e, desses casos recorrentes, 75% serão sintomáticos, sendo 95% episódios de cistite e 5% de pielonefrite aguda. Nessas mulheres com infecções recorrentes do trato urinário, uma colonização periuretral de longa duração com a bactéria infectante frequentemente precede o processo infeccioso. Células epiteliais obtidas da região periuretral, vaginal e bucal dessas pacientes com infecções recorrentes demonstram maior receptividade para cepas de *E. coli* (WARREN, 1996). Em mulheres ocorre uma associação entre atividade sexual e infecções urinárias uma vez que, durante o intercuro sexual, bactérias colonizadoras da área periuretral podem ser introduzidas na uretra e progredir ao nível de bexiga ou rins. A hipótese de transmissão sexual de uropatógenos tem sido investigada, mas encontram-se poucos estudos a respeito (FOXMAN et al., 1997). O uso de diafragmas vaginais também tem sido relatado como fator predisponente para o incremento nas taxas de infecções urinárias entre mulheres jovens (KUNIN, 1991).

A incidência de bacteriúria é alta em gestantes (6 - 14%). Quando essas pacientes não são tratadas, podem desenvolver pielonefrite nos estágios mais tardios da gravidez ou terem partos prematuros com recém-natos de baixo peso (REID et al., 1983).

Em homens, após a infância, a incidência de infecções do trato urinário diminui marcadamente. Presumivelmente, a epiderme periuretral seca do sexo masculino é menos colonizada por uropatógenos em relação à área periuretral mucosa das mulheres. Em homens idosos a ocorrência de infecções urinárias frequentemente é associada com hipertrofia benigna da próstata (WARREN, 1996).

Indivíduos com anomalias urogenitais, como distensão aumentada da bexiga advinda de obstrução do fluxo causada por litíase, neoplasias ou má formação congênita, são particularmente suscetíveis a infecções do trato urinário. O mecanismo valvular vesicoureteral, em condições normais, previne refluxo da urina da bexiga para os ureteres, quando comprometido pode originar infecções da pélvis renal, como as pielonefrites (WARREN, 1996).

PARSONS, POLLEN e ANWAR (1980) pesquisaram a ação antiaderente de glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas produzidas por células do epitélio transicional da bexiga. Essas GAGs estão presentes em várias superfícies mucosas e o fato de serem extremamente hidrofílicas origina uma camada de água na superfície epitelial íntegra. Considerando que a interação entre a célula bacteriana e a célula eucariótica requer um ambiente hidrofóbico, a presença de moléculas de água compromete a adesão celular. Dessa forma, a integridade do tecido é um fator fundamental de resistência do hospedeiro aos processos infecciosos. Na prática clínica observa-se que injúrias teciduais causadas por corpos estranhos, como a inserção de cateteres, entre outros, constituem fatores que predispõem o indivíduo a infecções do trato urinário.

Estudos de colonização bacteriana *in vitro*, que utilizam ensaios de aderência, sugerem uma predisposição hereditária para recorrências de infecções do trato urinário. Indivíduos não secretores ou com baixos níveis de expressão de alguns grupos de antígenos sanguíneos, como o A, B, H e de Lewis, são suscetíveis a infecções urinárias recorrentes (STAPLETON et al., 1998). Mulheres suscetíveis a infecções recorrentes possuem, nas diferentes áreas do trato urinário, alta proporção de células-alvo com receptores para *E. coli*. A dimensão, a natureza e a distribuição dessas áreas receptivas podem ser influenciadas por ação de hormônios, por ausência de secreção desses tipos sanguíneos (A, B, H e de Lewis) e por outros fatores do hospedeiro, como uma deficiente resposta imune (REID; BROOKS; BACON, 1983).

Hospedeiros imunossuprimidos são particularmente predispostos a infecções por bacilos Gram-negativos, os quais causam considerável morbidade e mortalidade nesse grupo. Como as infecções do trato urinário são majoritariamente causadas por bacilos Gram-negativos, pacientes diabéticos, transplantados com órgãos sólidos, neutropênicos em geral e aidéticos constituem hospedeiros suscetíveis para o desenvolvimento dessas infecções, que se apresentam com graus elevados de severidade (RUBIN; RUBIN, 1997).

A ingestão adequada de líquidos gera um mecanismo hidrodinâmico que em trato urinário sem anormalidades anatômicas ou funcionais promove uma eficiente

diurese, que age diluindo o inóculo bacteriano e, quando associado à micção regular, origina um fluxo urinário capaz de eliminar as bactérias colonizadoras da uretra (HUNT; WALLER, 1994; ECKFORD; KEANE; LAMOND, 1995).

O'GRADY e CATTELL (1966) demonstraram a ação diluente da diurese hídrica e da micção sobre a concentração de bactérias na urina. O tempo máximo de geração de bactérias entéricas na urina é de aproximadamente 20 minutos. O ideal é que o volume de perfusão seja adicionado pelo organismo de forma rápida e suficiente, de modo a diluir o inóculo bacteriano pela metade a cada intervalo de tempo em que ocorre duplicação bacteriana. Fundamentando-se nesses achados HAARST, ANDEL e HELDEWEG (2001) enfatizam a necessidade de se incluir, na anamnese de mulheres com infecções urinárias recorrentes, o controle do volume miccional diário.

3.3 *Escherichia coli*

Esse microrganismo faz parte da microbiota intestinal de humanos, sendo que a sua presença em água é considerada um indicador de contaminação fecal. São bacilos Gram-negativos com dimensões aproximadas de 0,5 μm por 2 μm , anaeróbios facultativos, pertencem à família *Enterobacteriaceae* e, quando móveis, a motilidade ocorre por ação de flagelos peritríquios. Fermentam a D-glicose com produção de gás. Embora façam parte da microbiota do intestino de indivíduos saudáveis, em organismos hígidos ou imunocomprometidos, podem causar infecções extra-intestinais e intestinais (BROCK; MADIGAN, 1991; MURRAY et al., 1999).

As cepas de *E. coli* uropatogênicas estão também relacionadas com bacteriemia e possuem elementos genéticos distintos que as distinguem de outras cepas de *E. coli* pertencentes à microbiota intestinal, ou causadoras de outras doenças extra-intestinais como meningite e sepsis neonatal (WARREN, 1996).

3.4 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE BACTERIANA

As cepas de *E. coli* associadas com doenças extra-intestinais, como pielonefrite e sepsis, apresentam aspectos fenotípicos específicos e constituem um grupo heterogêneo de isolados expressando um número limitado de antígenos somáticos (O), capsulares (K) e flagelares (H). As cepas virulentas de *E. coli* tipicamente carregam em sua molécula de ácido desoxirribonucléico (ADN) grandes blocos de genes que formam ilhas associadas à patogenicidade (PAI). Esses genes codificam a expressão de vários fatores de virulência: moléculas adesivas, toxinas (hemolisina formadora de poro, lipopolissacárides), fator necrotizante citotóxico 1 (CNF 1), aerobactina (age no seqüestro do ferro sérico), antígenos capsulares, além de fatores que aumentam a resistência bacteriana à atividade bactericida do soro (TULLUS et al., 1991; FIORENTINI et al., 1995; MOBLEY, 2000).

Em cepas de *E. coli* associadas à pielonefrite aguda tem sido relatada a secreção de um sistema de autotransporte de proteínas (SAT). Nesse sistema, as proteínas são translocadas através da membrana interna e, a partir daí, atravessam a membrana externa com auxílio de uma porina com estrutura β -barril formada por domínios autotransportadores carboxiterminais (MOBLEY, 2000).

3.5 RELEVÂNCIA DO PROCESSO DE ADESÃO BACTERIANA

A capacidade de adesão bacteriana a células epiteliais de mamíferos constitui um importante passo no estabelecimento do processo infeccioso nas superfícies mucosas. Acredita-se que a aderência favoreça os microrganismos por lhes permitir resistir à ação de limpeza exercida pelas secreções como lágrimas, saliva e urina. A aderência promove também a ligação bacteriana ao tecido-alvo específico dentro do hospedeiro e, dessa forma, a bactéria pode se multiplicar e liberar moléculas de toxinas em concentrações mais elevadas (KUNIN, 1991).

O processo de adesão requer uma interação molecular precisa entre os sítios receptores das células do hospedeiro e as adesinas bacterianas, que são proteínas

especializadas para essa finalidade. Essa ligação receptor-adesina deve ser capaz de superar as forças eletrostáticas repulsivas geradas pelas cargas negativas tanto da superfície celular eucariótica, quanto da superfície do corpo bacteriano. As adesinas que funcionam sobre um meio-ambiente podem não funcionar ou não ser expressas em outro sítio, além de que, os receptores eucarióticos para essas adesinas podem ser restritos anatomicamente. A capacidade de variação de fase capacita o patógeno a se adaptar a diferentes condições do meio. Os microrganismos que expressam uma adesina específica para os receptores de um sítio possuem vantagem seletiva sobre os demais e conseguem estabelecer o seu nicho. Por outro lado, quando a expressão de uma adesina prejudica o microrganismo - por exemplo, estimula a resposta imune do hospedeiro - pode ocorrer supressão da sua expressão através do fenômeno de variação de fase (WARREN, 1996).

Segundo EDÉN (1976), para muitas espécies bacterianas a adesão às superfícies mucosas constitui um requisito essencial para o estabelecimento do processo infeccioso. Assim como as cepas de estreptococos beta-hemolíticos, antes de causar faringite, necessitam aderir à mucosa da cavidade oral, da mesma forma os gonococos aderem ao epitélio vaginal e uretral nos estágios iniciais das uretrites. As bactérias uropatogênicas não fogem à regra e, como as demais, necessitam aderir ao uroepitélio para posteriormente provocar uma infecção.

A adesão ao epitélio intestinal tem sido demonstrada como o primeiro estágio da infecção causada por cepas de *E. coli* diarreioagênicas. O emprego de linhagens celulares eucarióticas tem sido muito útil para a detecção e caracterização de propriedades de virulência em *E. coli*, especialmente das cepas diarreioagênicas, ou seja, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Padrões distintos de aderência a certas linhagens celulares (HeLa ou HEp-2) permitem a identificação de diferentes categorias de patógenos gastrointestinais, como *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) e *E. coli* com aderência difusa (DAEC) (MARQUES et al., 1995). A aderência localizada é típica de cepas de EPEC que se agrupam em microcolônias na camada epitelial do intestino delgado. Nessa lesão a bactéria se liga à borda dos

enterócitos ocasionando destruição da superfície apical, sendo caracterizada pela elevação da membrana celular com formação de uma estrutura em pedestal (ALBERT et al., 1991; FOSTER et al., 1999). O mecanismo de formação da aderência localizada tem sido objeto de estudo, porém, há muitas hipóteses e poucas certezas. Sugere-se que ao se dividirem, as bactérias permanecem ligadas às células irmãs através de adesinas interespecies, que reconhecem tanto receptores da célula eucariótica, quanto da superfície bacteriana (ROTH et al., 1995). Esse arranjo espacial resulta em microcolônias apicalmente ligadas que funcionam como um organismo multicelular. A aderência localizada é mediada por um plasmídeo cujo produto gênico é denominado “fator aderente de EPEC” (EAF). A sonda de (ADN) construída especificamente para a seqüência gênica EAF permite a identificação molecular das cepas de EPEC com aderência localizada. O plasmídeo EAF codifica para uma estrutura de adesão responsável pela ligação inicial ao epitélio e subsequente formação de agregados bacterianos através da ligação bactéria-bactéria, resultando na formação de microcolônias com aspecto tri-dimensional (TOBE; SASAKAWA, 2001). Essa lesão é mediada por uma proteína de membrana externa, de codificação cromossômica, denominada “intimina”, porém, segundo FOSTER et al. (1999), cepas diarreio gênicas de *E. coli* que não expressam intimina também podem aderir a células epiteliais intestinais e provocar lesões. Outras adesinas de origem cromossomal têm sido implicadas na formação da lesão codificada pelo plasmídeo EAF e se encontram sob investigação.

A categoria de *E. coli* diarreio gênicas definida como EA_ggEC produz um padrão de adesão a células HEp-2 caracterizado pela ligação à superfície celular na forma de “pilhas de tijolos”. O fenótipo de aderência agregativa está associado à presença de um plasmídeo para cuja seqüência gênica foi desenvolvida uma sonda de ADN. Ensaios de hibridização permitem a identificação molecular dessa propriedade adesiva (GOMES; ABE; MARQUES, 1995).

Os tipos celulares que constituem o epitélio do trato urinário diferem na capacidade de ligação a bactérias aderentes. As cepas pielonefritogênicas de *E. coli* reconhecem receptores tanto de células transicionais dos ureteres e bexiga quanto de

células escamosas da uretra e genitália externa. As cepas não pielonefritogênicas, por sua vez, ligam-se preferentemente a receptores de células escamosas (EDÉN, 1986). Ao contrário do que ocorre com as cepas de *E. coli* diarreioogênicas em relação às cepas de *E. coli* uropatogênicas, ainda não existem estudos que apontem características especiais sobre o mecanismo de interação celular que resulta no processo de adesão.

Uma vez que a aderência tem por objetivo justamente resistir à ação de lavagem das superfícies epiteliais exercida pelas secreções, outros mecanismos de defesa do hospedeiro são necessários para remover organismos aderentes. Além da proteção física que a superfície mucosa representa, ela também secreta vários fatores antibacterianos inespecíficos como imunoglobulina A, lisosima, lactoferrina e peptídeos com atividade antimicrobiana (BROGDEN, 1995).

3.6 PILI OU FÍMBRIA

HAGBERG et al. (1981) referem-se a pili ou fimbria como apêndices filamentosos de superfície bacteriana, não flagelares, compostos por repetidas subunidades protéicas hidrofóbicas. As fimbrias podem ser rígidas ou flexíveis, constituídas por duas distintas subunidades: um cilindro de diâmetro variável, entre 5 a 10 nm, composto de repetidas subunidades protéicas e uma estrutura mais fina, a fibrila, também de origem protéica, disposta na extremidade do cilindro. O comprimento total da fimbria apresenta considerável variação, podendo atingir aproximadamente 42 nm. A estrutura da fimbria, a disposição de suas moléculas adesivas e a sua biogênese representam um modelo organizacional comum e altamente conservado nas bactérias. Desse modo, a configuração das moléculas adesivas pode ser arranjada de forma a garantir eficiente acesso ao receptor eucariótico, permitindo interações seletivas e específicas (KUEHN et al., 1992; DONNENBERG; WELCH, 1996).

As adesinas freqüentemente se localizam nas fimbrias e, nesse caso, são denominadas de adesinas fimbriais. Quando se localizam na membrana externa ou na cápsula, constituem as adesinas afimbriais (KUNIN, 1991).

A análise ultra-estrutural da fibrila demonstra flexibilidade proporcionada por um arranjo helicoidal aberto capaz de adquirir a conformação fibrilar. A alternância entre o estado helicoidal e fibrilar permite à bactéria aderir e colonizar as superfícies epiteliais. A biogênese do pili na célula bacteriana requer um aparato protéico especializado, no qual atuam chaperones periplasmáticos semelhantes a imunoglobulinas e proteínas localizadas na membrana externa, que agem como agentes introdutores. As funções desempenhadas pelos chaperones consistem na importação das subunidades do pili do citoplasma bacteriano para dentro do espaço periplasmático; proteção contra a ação de proteases periplasmáticas; promoção do dobramento eficiente das subunidades com bloqueio na produção de agregados protéicos não produtíveis; entrega das subunidades a carreadores de membrana externa e direcionamento das diferentes subunidades para formação correta dos polímeros (JONES; DODSON; HULTGREN, 1996).

3.7 HEMAGLUTININAS E ADESÃO BACTERIANA

O fenômeno de interação bactéria-célula eucariótica tem sido estudado intensamente nos últimos anos através de ensaios *in vitro*, nos quais células do hospedeiro são incubadas com a bactéria em estudo. A natureza química de adesinas bacterianas, que possuem receptores em eritrócitos de diferentes espécies animais, pode ser indiretamente pesquisada reagindo-se suspensões bacterianas com suspensões de eritrócitos na presença de diferentes carboidratos, que sejam constituintes de antígenos eritrocitários com função de receptores (EDÉN, 1986).

Empregando o método da hemaglutinação (HA), DUGUID, CLEGG e WILSON (1979) demonstraram que adesinas localizadas nas fímbrias de certas bactérias entéricas aglutinavam eritrócitos de diferentes espécies animais e essa aglutinação podia ou não ser inibida na presença de determinados açúcares. As adesinas inibidas na presença de D-manose a 2,5% (p/v) ou de metil- α -D-manosídeo foram denominadas de Manose-sensíveis (MS) e correlacionadas a um tipo de fímbria denominada fímbria tipo 1. Constataram, também, que o crescimento bacteriano

estático a 37° C favorecia o desenvolvimento da fimbria tipo 1 e que o seu potencial hemaglutinante ficava mais bem evidenciado na presença de eritrócitos de cobaia. Outras cepas demonstraram um comportamento diferente, não foram afetadas pela adição de D-manose e desenvolveram melhor atividade hemaglutinante quando cultivadas em ágar a 37° C. Os testes de hemaglutinação para essas cepas Manose-resistentes (MR) requeriam uma suspensão bacteriana espessa, na ordem de 20 a 100 bactérias por eritrócito e temperaturas em torno de 3 a 5° C. Através dessa metodologia, os pesquisadores classificaram as cepas bacterianas em relação à hemaglutinação em: cepas MSMR, expressando as duas hemaglutininas; cepas MS, expressando apenas hemaglutininas MS; cepas MR, expressando somente hemaglutininas MR; e cepas MS-MR-, não apresentando atividade hemaglutinante. Na análise ultra-estrutural das cepas que apresentavam hemaglutinação MR nem sempre foram visualizadas fimbrias.

GREEN e THOMAS (1981) relacionaram hemaglutinação e virulência, demonstrando que cepas hemaglutinantes de *E. coli* eram mais patogênicas que cepas não hemaglutinantes. As cepas de *E. coli* uropatogênicas apresentaram maior capacidade hemaglutinante em relação a isolados fecais. Os pesquisadores concluíram que a hemaglutinação é um indicador da capacidade de ligação das bactérias a membranas eucarióticas e pode estar relacionada à capacidade das cepas em se ligarem à superfície das células epiteliais promovendo a colonização.

HAGBERG et al. (1981) analisaram 453 isolados de *E. coli* obtidos de urina de crianças com infecções do trato urinário e de fezes de crianças saudáveis. Através desse estudo demonstraram uma relação significativa entre a fonte do microrganismo e sua capacidade de aderir a eritrócitos humanos, eritrócitos de cobaia e a células uroepiteliais, na presença ou ausência de D-manose. Os seguintes padrões de hemaglutinação foram encontrados: 1- somente hemaglutinação MR para eritrócitos humanos; 2- hemaglutinação MR para eritrócitos humanos e simultaneamente hemaglutinação MS com eritrócitos de cobaia; 3- somente hemaglutinação MS com eritrócitos de cobaia e de outras espécies não humanas; 4- ausência de hemaglutinação. As cepas de *E. coli* que demonstraram o fenótipo de hemaglutinação MR

isoladamente, ou em associação com hemaglutinação MS, ligaram-se em altas taxas a células uroepiteliais humanas. Bactérias expressando somente hemaglutinação MS ligaram-se em baixo número a células uroepiteliais humanas, enquanto que as cepas não hemaglutinantes não se ligaram a células uroepiteliais. As cepas de *E. coli*, apresentando hemaglutinação MR estavam implicadas significativamente em pielonefrites, a seguir em cistites e em raros casos à bacteriúria assintomática. Inversamente, as cepas com hemaglutinação MS e as não aglutinantes foram encontradas na seguinte ordem: bacteriúria assintomática, cistite e por último em pielonefrite. A análise ultra-estrutural das cepas de *E. coli* correlacionou diretamente a presença de pili com a capacidade de adesão a células uroepiteliais humanas. Os autores concluíram que antígenos de superfície que medeiam ligação MR a eritrócitos humanos possivelmente constituem um fator seletivo que capacita isolados intestinais de *E. coli* a colonizarem o trato urinário.

OFEK, MOSEK e SHARON (1981) relacionaram a capacidade de ligação de cepas de *E. coli* a resíduos de manose de células leveduriformes e de eritrócitos com a adesão a resíduos de manose encontrados sobre o epitélio urinário e em células fagocitárias. Os autores também demonstraram que as ligações MS a células uroepiteliais eram bloqueadas por metil α -D manosídeo e também por anticorpos antifímbria tipo 1, caracterizando, dessa forma, que a aderência a resíduos de manose no trato urinário é mediada por fímbria tipo 1.

PARRY et al. (1983) obtiveram resultados semelhantes aos de HAGBERG et al. (1981), quando analisaram cepas de *E. coli* isoladas da urina de mulheres com infecções do trato urinário e cepas de *E. coli* isoladas de fezes de controles saudáveis. Esses pesquisadores demonstraram a existência de duas formas genética e quimicamente distintas de pili. Nessa pesquisa também foi observado que preparados altamente purificados de fimbrias obtidas de cepas de *E. coli* aglutinavam eritrócitos humanos. Cepas de *E. coli* apresentando MRHA e fimbriadas, quando desenvolvidas a 16°C ou tratadas com substâncias que removem as fimbrias (dodecil sulfato de sódio ou com tiocianato de potássio), perderam a capacidade hemaglutinante manose-resistente. Uma demonstração direta da associação entre a presença de fímbria, a

capacidade hemaglutinante e a adesão de *E. coli* uropatogênica a células epiteliais é demonstrada pelos autores através do experimento no qual fimbrias MR, marcadas com ^{125}I , ligaram-se especificamente a essas células. Os autores comprovaram que a atividade MSHA está associada à presença da fimbria tipo 1, enquanto que a atividade MRHA relaciona-se à presença de fimbrias que são morfologicamente distintas da fimbria tipo 1, corroborando os estudos de microscopia eletrônica realizados por VÄISÄNEM, LOUNATMAA e KORHONEN (1982).

3.8 FÍMBRIA TIPO 1

As adesinas constituintes da fimbria tipo 1 são basicamente caracterizadas por aglutinação manose-sensível de eritrócitos de cobaia, porém, compreendem um grupo relativamente heterogêneo (EDÉN, 1986). O determinante de adesividade da fimbria tipo 1 em *E. coli*, assim como nas demais enterobactérias, é codificado pela seqüência gênica “pil” ou “fim” (filamento). Essa seqüência é constituída por nove genes que codificam para proteínas estruturais e regulatórias e que são denominadas moléculas de adesão FimH. O gene fimH origina uma família heterogênea de adesinas FimH que são genericamente mencionadas na literatura como lectinas que se ligam a manosídeos. Esses genes que comandam a síntese da fimbria tipo 1 são arranjados em um operom situado no cromossoma da *E. coli*. São encontrados em uma vasta quantidade dessas cepas a despeito de sua fonte, além disso, possuem uma distribuição ubíqua em outras espécies de enterobactérias. Ao contrário da fimbria P, o processo de biogênese da fimbria tipo 1 não está claramente definido; sabe-se que o gene fimA (ou piliA) codifica o monômero de pilina que faz a haste do pilus. Há indícios que o FimF é um iniciador e o FimG exerce papel de regulador do comprimento do pili, podendo haver inversão nesses papéis (KEITH et al., 1990; JONES; DODSON; HULTGREN, 1996; SERVICE, 1997; SVANBORG; GODALY, 1997).

A proporção de cepas de *E. coli* que produz fimbria tipo 1 varia com as condições de cultura, ocorrendo o máximo de expressão quando cultivadas em meio líquido e sob condições estáticas (DONNENBERG; WELCH, 1996). A fimbria tipo 1

caracteriza-se por ser uma estrutura helicoidal constituída de uma parte em bastão de aproximadamente 7 nm de diâmetro, podendo variar dentro de uma ampla faixa (2 a 10 nm), enquanto que o comprimento médio é em torno de 0,2 a 2,0 μm , chegando a alcançar até 4 μm . Na porção terminal conecta-se à fibrila, que possui abertura helicoidal, com extensão aproximada de 16 nm. Pequenas quantidades da molécula de adesão FimH podem ser encontradas a intervalos regulares ao longo da haste e também no ápice da fibrila (ROBERTS, 1987; JONES; DODSON; HULTGREN, 1996; SOKURENKO et al., 1997).

3.8.1 Receptores e Expressão da Fímbria Tipo 1

Os receptores para fímbria tipo 1 constituem uma variedade de estruturas de superfície celular contendo manose, aos quais as adesinas da fímbria tipo 1 se ligam. Esses receptores incluem uma proteína de 65 kDa presente na superfície de eritrócitos de cobaia, moléculas de CD11 e CD18 da superfície de leucócitos e componentes do muco urinário. A glicoproteína de TAMM-HORSFALL é o componente principal do muco urinário, sendo produzida pelas células da alça ascendente de Henle e pelas células do túbulo convoluto distal. A bactéria que expressa a fímbria tipo 1 adere às mucosas uretral e bucal, aos túbulos proximais do rim e à camada muscular da bexiga. Liga-se também à IgA secretora, à fibronectina e à laminina (CHICK et al., 1981; KUNIN, 1991; MOBLEY; WARREN, 1996; SVANBORG; GODALY, 1997).

A adesina da fímbria tipo 1 liga-se a um sítio hidrofóbico do receptor oligomanosídeo constituído pelo seguinte trissacarídeo: $\alpha\text{-D-Manp}(1\text{-}3)\text{-}\beta\text{-D-Manp}(1\text{-}4)\text{-D-GlcNac}$ ($\alpha\text{-D-manopiranosose}(1\text{-}3)\text{-}\beta\text{-D-manopiranosídeo}(1\text{-}4)\text{-D-2-acetamida-2-dexosi-D-glicose}$), sendo que essa ligação é bloqueada por D-manose e seus derivados. A superfície apical do uroepitélio de mamíferos é recoberta por placas de 0,3 a 0,5 μm que ocupam de 70 a 80% da sua área, cepas de *E. coli* contendo fímbria tipo 1 ligam-se a resíduos de manose das glicoproteínas que formam essas estruturas (JONES; DODSON; HULTGREN, 1996; WU; SUN; MEDINA, 1996).

As bactérias que contêm a fimbria tipo 1 ligam-se a neutrófilos são internalizadas e mortas na ausência de opsoninas e de uma forma que pode ser inibida pela manose (GBARAH et al., 1991). Outra hipótese é que a ligação da adesina FimH a moléculas de CD11 e CD18 poderia facultar o deslocamento da bactéria no trato urinário. KEITH et al. (1990) realizaram experimentos que correlacionaram a piliação tipo 1 a um incremento na resistência à morte por fagocitose e essa resistência é dependente da adesina FimH.

3.8.2 Papel da Fimbria Tipo 1 na Patogênese das Infecções do Trato Urinário

As fimbrias tipo 1 ocorrem na maior parte dos isolados clínicos virulentos e avirulentos. Conseqüentemente há muita controvérsia na literatura sobre a sua influência na severidade das infecções do trato urinário (SOKURENKO et al., 1997; SVANBORG; GODALY, 1997). Contudo, levantamentos epidemiológicos evidenciam a associação de *E. coli* expressando fimbria tipo 1 com aumento do potencial em causar doenças extra-intestinais. Evidências que contribuem para a associação da MSHA com infecção do trato urinário vêm de ensaios que usam inibidores específicos que bloqueiam a ligação da molécula adesiva de Fim-H, localizada na fimbria tipo 1, a seus receptores contendo resíduos de manose. Pesquisadores obtiveram baixos níveis de bacteriúria em ratos inoculados com suspensão contendo células de *E. coli* com fimbria tipo 1 e D-manose ou derivados manosídicos (LIM et al., 1998). Vacinas direcionadas à molécula de adesão FimH bloqueiam a adesão de cepas de *E. coli* com fimbria tipo 1 aos resíduos de manose da célula do hospedeiro, prevenindo infecção urinária em ratos (SVANBORG; GODALY, 1997). Na urina também são detectados oligossacarídeos de baixo peso molecular, contendo manose, e que agem inibindo naturalmente as ligações lectínicas, fato que pode ser interpretado como um mecanismo de defesa do hospedeiro. Portanto, esses resultados demonstram que a fimbria tipo 1 aumenta o poder de virulência de bactérias uropatogênicas.

SOKURENKO et al. (1997) demonstraram que a fimbria tipo 1 pode exibir

diferentes fenótipos devido a capacidade apresentada pelo gene *fimH* em codificar a subunidade lectínica; esses fenótipos são diferentemente distribuídos entre cepas de origem intestinal e cepas uropatogênicas. Dessa forma, é possível que certos fenótipos variantes da fímbria tipo 1 contribuam mais que outros para a virulência de cepas de *E. coli* no trato urinário.

A ligação da fímbria tipo 1 ao muco urinário, através da proteína de TAMM-HORSFALL, pode ter sua finalidade interpretada em duplo sentido: ou promove aumento na excreção da bactéria aderida ao muco urinário, constituindo, assim, um importante mecanismo de defesa não imunológico do hospedeiro, ou representa mais um fator de virulência que capacita a bactéria a transpor a camada de muco no trato urinário (CHICK et al., 1981; HAGBERG et al., 1981).

BASTOS, SANTOS e TAMASHIRO (2001) examinaram a fagocitose de células de *E. coli* com fímbria tipo 1, recobertas por proteína de TAMM-HORSFALL em diferentes concentrações, por macrófagos peritoneais de rato. Constataram significativa redução da fagocitose na presença de altas concentrações da proteína de TAMM-HORSFALL. Os autores concluíram que essa proteína, quando em concentrações normais, age ligando-se à célula bacteriana, promovendo a sua eliminação do ambiente urinário. Porém, em certos estados patológicos, a proteína de TAMM-HORSFALL pode acumular-se no parênquima renal e atuar como um sítio de ligação para cepas de *E. coli* com fímbria tipo 1. Dessa forma, a bactéria fica inteiramente recoberta por essa proteína e protegida da fagocitose por macrófagos, o que permite a sua persistência no trato urinário.

Pelo fato do pili tipo 1 ser virtualmente encontrado em todas as cepas de *E. coli* (patogênicas ou não), vários estudos têm investigado a interferência de fatores metabólicos do ambiente urinário - como, por exemplo, a alteração nos níveis hormonais - sobre a sua expressão. Talvez esses fatores possam contribuir para incrementar o mecanismo bacteriano de variação de fase e contribuir para o seu potencial de invasão. REID, BROOKS e BACON (1983) investigaram a variação de receptividade das células uroepiteliais humanas durante o ciclo menstrual e a gravidez

para a ligação da *E. coli* com adesinas MS. Embora os resultados não tenham apresentado correlação com os níveis de estrogênios, os autores sugerem que as trocas hormonais podem proporcionar um incremento na receptividade do uroepitélio para a ligação de cepas de *E. coli*. Esse achado pode justificar o fato de mulheres adultas serem particularmente suscetíveis a infecções urinárias, especialmente nos estágios iniciais de gravidez e em torno do 12º dia do ciclo menstrual. Os autores também evidenciaram que cepas de *E. coli* com fímbria tipo 1 ligaram-se mais a células uroepiteliais escamosas (originadas do trígono da bexiga e da uretra) do que a células transicionais (originadas dos rins, dos ureteres e de certas regiões da bexiga).

A função de receptores contendo manose no trato urinário ainda é desconhecida. A maioria das cepas bacterianas que expressa somente adesinas MS liga-se pobremente a células uroepiteliais humanas e somente a células epiteliais escamosas, embora existam exceções e certas cepas MS apresentem altas taxas de adesão. Em resumo, sugere-se que as adesinas manose-sensíveis conferem à bactéria o poder de exercer dois distintos mecanismos de virulência no trato urinário: 1 - ligação ao muco urinário que é composto por glicoproteína de TAMM-HORSFALL, a qual contém resíduos de manose; 2 - promoção da fagocitose por ligação aos polimorfonucleares (EDÉN, 1986).

3.9 FÍMBRIA TIPO II OU FÍMBRIA P

O símbolo P para esse tipo de fímbria foi escolhido por duas razões: 1 - cepas de *E. coli* com fímbria P freqüentemente estão associadas à pielonefrite aguda; 2 – as cepas de *E. coli* P fimbriadas aderem especificamente a antígenos do grupo sanguíneo P (SVANBORG; GODALY, 1997).

As fimbrias P têm como receptor um componente dissacarídeo do grupo sanguíneo P, que está presente na membrana de eritrócitos de indivíduos do grupo sanguíneo P e também ocorre na superfície de células epiteliais humanas. Dessa forma, evidencia-se a associação entre MRHA de eritrócitos humanos, adesão a células epiteliais e a presença de fímbria P sobre a superfície bacteriana (MÖLLBY et al.,

1983; PARRY et al., 1983).

A organização da fimbria P tem sido elucidada através de estudos de seqüenciamento do ADN cromossomal. A fimbria P é codificada pela seqüência genômica cromossomal denominada “pilus associado à pielonefrite” (pap) e a fração papG codifica a molécula de adesina PapG localizada no topo da fimbria (ROBERTS et al., 1994; JOHNSON et al., 1997a; SVANBORG; GODALY, 1997; RUBIN; RUBIN, 1997). A seqüência inteira da região do ADN da *E. coli* relacionada ao gene pap já foi determinada e as funções de muitos dos seus produtos já foram descritas. Na biossíntese e expressão do pili P, pelo menos 11 genes do genoma da *E. coli* estão envolvidos codificando para diferentes proteínas: PapA, PapB, PapC, PapD, PapE, PapF, PapG, PapH, PapI e demais moléculas de adesão (KUEHN et al., 1992; JONES; DODSON; HULTGREN, 1996).

A função da PapF é funcionar como um iniciador na formação do pilus. Aparentemente, a PapK pode substituir essa função, embora fracamente, na ausência de PapF. Repetidas subunidades protéicas PapA arranjadas no formato de um bastão helicoidal compõem o bulbo da parte em bastão do pilus. As subunidades PapG, PapE e PapF são codificadas por genes da extremidade distal do operom e logo que são expressas localizam-se no topo do pili. A proteína PapE forma a massa da fibrila e a PapF é requerida para adaptar a PapG à estrutura da fibrila. A montagem do pili depende da PapD que é um chaperone periplasmático com ação sobre a interação entre as subunidades do pili durante a biogênese, a PapJ pode funcionar como uma auxiliar de chaperone. A proteína PapC funciona provavelmente como uma plataforma de montagem na membrana externa, enquanto que a PapH atua promovendo a ligação da parte em bastão do pilus à membrana externa da bactéria. A capacidade da PapE em se ligar à fibronectina proporciona aumento na acessibilidade bacteriana a receptores do hospedeiro e sugere que a fibrila desempenha múltiplas funções como determinante de virulência da fimbria P. Ao final do processo de montagem do pilus, a ordem das subunidades que compõem a fibrila na direção da extremidade externa para a interna é a seguinte: PapG, PapF, PapE e PapK (KUEHN et al., 1992; JONES; DODSON; HULTGREN, 1996).

A regulação da expressão do pilus P é dependente dos genes *papB* e *papI* localizados acima do promotor *pap*, sendo que esse controle ocorre por metilação de dois sítios na região do promotor. Alterações de metilação estão relacionadas à capacidade de variação de fase, na qual a bactéria pode expressar ou não o pilus de acordo com as exigências do meio ambiente (BRAATEN et al., 1994).

A fimbria P é uma estrutura heteropolimérica composta por um talo rígido de 1µm de comprimento arranjado em hélices de aproximadamente 7 a 10 nm de diâmetro e ligado na sua extremidade distal a uma fibrila flexível. O pilus apresenta uma única fibrila. A fibrila apresenta dimensões variáveis, podendo medir de 26 nm até 58 nm de comprimento por 3 nm diâmetro, sendo que suas hélices ocorrem a intervalos de 15 nm indicando uma estrutura helicoidal aberta e flexível. No ápice da fibrila liga-se a proteína PapG, que é uma adesina com especificidade de ligação para sacarídeos contendo a região Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β (α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo) (KUEHN et al., 1992; JONES; DODSON; HULTGREN, 1996).

A fimbria P revela considerável variação antigênica, originando subgrupos designados de F7, 1, 2, F11, F13 e outros. Essas variações antigênicas ocorrem somente em uma pequena região do determinante PapA (JONES; DODSON; HULTGREN, 1996).

Pesquisas demonstram que cepas de *E. coli* P fimbriadas, mas defectivas em expressar a adesina PapG, não conseguem causar pielonefrite em macacos por não aderirem ao epitélio renal, porém, são capazes de causar cistite (ROBERTS et al., 1994). O gene *papG* codifica para três variantes de adesinas PapG: GI, GII e GIII, cada qual com especificidade distinta para subgrupos de isoreceptores Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β . Das três classes de adesinas PapG é a PapGII que prevalece em cepas de *E. coli* causadoras de pielonefrite aguda. A variante PapGII (ou *papG*_{1A2}) prevalece, também, nas cepas de *E. coli* isoladas do sangue de pacientes que desenvolvem pielonefrite aguda seguida de septicemia. Quanto às características hemaglutinantes, aglutinam bem eritrócitos humanos do grupo sanguíneo P e pobremente eritrócitos de carneiro. A classe PapGIII (ou tipo *prsG*_{J96}) é menos prevalente em isolados clínicos e não

apresenta associação clara com doenças exceto, possivelmente, com cistite. Essas adesinas PapGIII aglutinam apenas eritrócitos de carneiro. A Pap GI (ou papG₁₉₆) aglutina somente eritrócitos humanos e a sua função permanece desconhecida. Ensaio com sondas altamente específicas para as três classes de adesinas PapG demonstraram no genoma da bactéria *E. coli* raras seqüências codificando para adesina PapGI (JONES; DODSON; HULTGREN, 1996; JOHNSON et al., 1997b; SVANBORG; GODALY, 1997). As três variantes da adesina PapG (classes I, II e III) diferem entre si ao exibirem diferentes preferências para substituintes na região **Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β** , fato esse que pode ser importante no direcionamento do tropismo tecidual e na determinação da patologia a ser desenvolvida no hospedeiro (JOHNSON et al., 1997a; JOHNSON et al., 1997b).

3.9.1 Receptores e Expressão da Fímbria P

Cepas de *E. coli* pielonefritogênicas aderem melhor *in vitro* a células uroepiteliais quando comparadas com cepas causadoras de cistite ou de bacteriúria assintomática. Essa capacidade das cepas pielonefritogênicas de aderir a células uroepiteliais está relacionada à hemaglutinação MR específica para eritrócitos humanos do grupo sanguíneo P (KÄLLENIUS et al., 1981). Os receptores da fímbria P são os carboidratos: **GalNac β -3Gal α 1-4Gal- β** (2 acetamida 2-desoxi-D-galactose α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosídeo) e o **Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β** , sendo que este último constitui a parte ativa dos receptores de membrana dos eritrócitos e das células uroepiteliais para cepas de *E. coli* pielonefritogênicas.

Esses açúcares ocorrem como parte do glicoesfingolípido correspondente aos antígenos P^K, P e P₁ do grupo sanguíneo humano P. Eritrócitos de indivíduos com fenótipo p defectivo não possuem esse glicoesfingolípido e, conseqüentemente, não são aglutináveis com cepas de *E. coli* P fimbriadas. Portanto, as globosséries desse glicoesfingolípido funcionam como moléculas receptoras da fímbria P e como antígenos do grupo sanguíneo P. A atividade dos diferentes membros dessa família de receptores varia conforme o subtipo de fímbria P. Dessa forma, a fímbria P pode ser

descrita como uma família de adesinas que reconhecem esses glicoesfingolipídeos como receptores, mas diferem na preferência do epítipo do receptor (KÄLLENIUS et al., 1981; MOBLEY; WARREN, 1996; SVANBORG; GODALY, 1997). Glicoesfingolipídeos contendo estruturas **Gal α (1→4)Gal β** têm sido descritos na membrana de células do tecido renal e em células epiteliais do trato urinário inferior. Esses achados levam a considerar que a presença de fímbria P, além de incrementar as chances da cepa bacteriana colonizar o trato urinário inferior, capacita-a para invasão do epitélio renal (KÄLLENIUS et al., 1981).

Os receptores **Gal α (1→4)Gal β** também são encontrados sobre células epiteliais do intestino grosso, o que presumivelmente explica, ao menos em parte, a capacidade das cepas P fimbriadas de persistirem no organismo do hospedeiro causando reinfecção no trato urinário. Em contraste, os leucócitos polimorfonucleares não têm receptores para a fímbria P, o que facilita a persistência de *E. coli* P fimbriada no sangue levando a casos de septicemia (IKÄHEIMO et al., 1996).

3.9.2 Papel da Fímbria P em Infecções do Trato Urinário

Dentre as formas de apresentação das infecções do trato urinário, a pielonefrite aguda é sem dúvida a mais preocupante devido ao seu potencial de causar cicatrizes renais irreversíveis e urosepsis (KUNIN, 1991). Embora a P-fimbriação em cepas de *E. coli* não seja o único fator de virulência na etiologia da pielonefrite aguda, é a propriedade que melhor se correlaciona com essa entidade clínica, sendo reportada em taxas acima de 95% em crianças e 50 a 90% em adultos (ROBERTS et al., 1994).

KÄLLENIUS et al. (1981) demonstraram cepas de *E. coli* P fimbriadas em 91% dos isolados clínicos obtidos de urina de pacientes com pielonefrite. Entre cepas causadoras de cistite e bacteriúria assintomática, a fímbria P foi encontrada em 19% e 14% dos casos, respectivamente. Somente 7% dos isolados fecais provenientes de controles saudáveis carregavam a fímbria P. As cepas de *E. coli* P fimbriadas recuperadas das fezes dos pacientes com pielonefrite, da sua área periuretral e urina

apresentavam-se idênticas bioquimicamente e sorologicamente, o que comprova a origem intestinal desses isolados.

E. coli com fimbria P é o organismo prevalente em casos de urosepsis em pacientes hígidos e com pielonefrite, atingindo taxas em torno de 90%, sendo que essas taxas variam diretamente com a severidade da infecção e inversamente com o grau de competência imunológica do hospedeiro (MOBLEY; WARREN, 1996; FÜNFSTÜCK et al., 1997).

Segundo RUBIN e RUBIN (1997), as cepas de *E. coli* isoladas de sangue de indivíduos hígidos com urosepsis secundária à pielonefrite geralmente expressam a fimbria P. Ao contrário, cepas não piliadas são freqüentemente isoladas do sangue de pacientes neutropênicos acometidos por pielonefrite seguida de sepsis, ou dos pacientes que apresentam defeitos funcionais nos leucócitos. A bactéria que expressa fimbria P normalmente apresenta um conjunto de outros fatores de virulência, como presença de outros tipos de fimbrias, produção de hemolisinas e associação a certos grupos de antígenos somáticos (sorogrupos "O") (TULLUS et al., 1991; JOHNSON et al., 1997a).

3.10 ADESINAS MANOSE-RESISTENTES NÃO FÍMBRIA P

Cepas uropatogênicas de *E. coli* com adesinas manose-resistentes ligam-se também a oligossacarídeos e receptores protéicos diferentes daqueles com estrutura Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β . Essas cepas foram designadas inicialmente como X-específicas. As cepas com adesinas X, ao contrário das cepas P-fimbriadas, ligam-se fracamente a células epiteliais transicionais e são independentes do grupo sanguíneo P (EDÉN, 1986). O grupo X engloba membros de adesinas fimbriais da família S e da família Dr, além de outras adesinas não fimbriais (MOBLEY; WARREN, 1996).

3.10.1 Fímbria S

A família de fímbria S consiste da fímbria S que é codificada pelo operom *sfa*; a fímbria F1C codificada pelo operom *foc* e a fímbria S/F1C codificada pelo operom *sfr*. A epidemiologia de infecções urinárias causadas por cepas de *E. coli* que produzem fímbrias da família S ainda não está bem esclarecida (MOBLEY; WARREN, 1996).

IKÄHEIMO et al. (1993) estudaram cepas de *E. coli* isoladas de urina de 178 pacientes do sexo feminino com episódio de cistite e compararam com 287 cepas de *E. coli* isoladas de fezes de adultos saudáveis. Quanto à presença de adesinas foi constatado que 25,3% das cepas uropatogênicas expressaram fímbria P; 19,7% outras adesinas MR não-P e 13,5% fímbria 1C. Nos isolados fecais 10,8% expressaram fímbria P; 1% outras adesinas MR não-P e 7,3% fímbria 1C. Em estudo posterior, utilizando os mesmos critérios, os autores pesquisaram as características das cepas de *E. coli* isoladas de mulheres com pielonefrite comunitária. Observaram que 67% das cepas pielonefritogênicas de *E. coli* expressaram a fímbria P, enquanto que a prevalência de adesinas manose-resistentes não P e fímbria tipo 1C foi baixa (4 e 8% respectivamente) (IKÄHEIMO et al., 1994). A fímbria S medeia a hemaglutinação de eritrócitos bovinos, que pode ser inibida por sialiloligossacarídeos ou por pré-tratamento dos eritrócitos com neuraminidase. Os receptores eritrocíticos para fímbria S são identificados como derivados da proteína de membrana glicoforina A que contém ácido N-acetilneuramínico-(α 2-3)-galactose-(β 1-3)-N-acetil-D-galactosamina. A fímbria S purificada liga-se a cortes de tecido de rins humanos, particularmente células epiteliais tubulares, células endoteliais e epitélio glomerular. *In vitro* a fímbria S liga-se, também, à laminina (MOBLEY; WARREN, 1996).

3.10.2 Adesinas da Família Dr

Os membros da família Dr podem ser tanto adesinas fimbriais como afimbriais. Fazem parte dessa família: a hemaglutinina Dr, também denominada adesina 075X; a

adesina AFA-I; a adesina AFA-III e a fimbria F 1845. O receptor específico para essas adesinas ainda não foi determinado: algumas compartilham, como receptor comum em eritrócitos, um antígeno do grupo sanguíneo Dr identificado como uma glicoproteína de membrana denominada pela sigla “DAF” (decay-accelerating factor). A função da DAF é proteger o tecido do hospedeiro contra danos causados pela ativação do complemento. Na literatura encontram-se poucos trabalhos a respeito da implicação das adesinas Dr em infecções urinárias (MOBLEY; WARREN, 1996). Cepas de *E. coli* que expressam hemaglutinina Dr têm sido reportadas ligando-se à membrana basal dos glomérulos e túbulos em rins humanos, sítios esses, distintos daqueles reconhecidos pela fimbria P. Embora a molécula de colágeno tipo IV possa ligar-se especificamente à adesina Dr, não se conhece ainda a identidade do seu receptor em células epiteliais humanas (MOBLEY; WARREN, 1996).

GOLUSZKO et al. (1997), ao estudarem a interação entre o receptor DAF e cepas de *E. coli* expressando adesinas DR, evidenciaram que essas cepas possuem capacidade invasiva para células HeLa, propondo que a interação mediada por receptor DAF capacita cepas de *E. coli* Dr⁺ a ascender no trato urinário e causar nefrite intersticial crônica. BOUGUÉNEC et al. (2001) desenvolveram um ensaio de PCR para detecção de adesinas AFA.

3.11 EXPRESSÃO SIMULTÂNEA DE ADESINAS MS E MR EM CEPAS DE *E. coli* UROPATOGÊNICAS

O mecanismo de variação de fase, no qual a bactéria pode expressar ou reprimir os genes que codificam para produção das diferentes adesinas, tem sido interpretado de formas distintas por diferentes pesquisadores. WU, SUN e MEDINA (1996) propõem que, nos estágios iniciais da infecção, a bactéria necessita superar a camada de muco para depois aderir ao epitélio e iniciar o processo infeccioso. Dessa forma, primeiramente ocorre a expressão de adesinas MS que se ligam à proteína de TAMM-HORSFALL e capacitam a bactéria a atravessar a barreira imposta pelo muco. Em estágios avançados da infecção, a bactéria perde a capacidade de expressar adesinas

MS e, portanto, não adere a resíduos de manose das células fagocitárias. No estágio seguinte, a bactéria expressa adesinas MR, que se ligam aos receptores glicolipídicos das células uroepiteliais mas não a polimorfonucleares, fato que permite a persistência do microrganismo no trato urinário. A mútua cooperação entre os dois fatores de virulência culmina no estabelecimento do processo infeccioso.

Segundo OFEK, MOSEK e SHARON (1981), a detecção de anticorpos contra a fimbria tipo 1 no soro de pacientes com pielonefrite, causada por *E. coli* manose-resistente, corrobora essa hipótese atestando a presença de bactérias com adesinas MS em certo estágio da infecção.

Para HAGBERG et al. (1981), as adesinas MS e MR agem competitivamente e a variação na quantidade de expressão de uma ou de outra determina o grau de severidade da infecção do trato urinário. Dessa forma, a expressão predominante de adesinas MR vai promover a ligação da bactéria a receptores glicolipídicos do epitélio do trato urinário superior e causar pielonefrite, enquanto que a produção de adesinas MS em maior quantidade promove a ligação bacteriana a resíduos de manose do muco urinário, podendo originar cistite.

3.12 MÉTODOS DE PESQUISA DE ADESINAS BACTERIANAS

3.12.1 Aderência a Células Epiteliais

Embora o termo aderência deva ser reservado apenas à ligação bacteriana a células epiteliais, na prática, observa-se que as bactérias podem interagir com vários outros tipos celulares como eritrócitos, espermatozóides e leucócitos.

A maioria dos métodos usados para mensurar ligação bacteriana promove o contato entre células epiteliais e o microrganismo em estudo. A seguir procede-se à lavagem das células para remover os microrganismos não aderentes; a preparação é fixada, corada e o número de bactérias é quantificado microscopicamente. A quantificação da capacidade adesiva bacteriana também pode ser feita por métodos radiométricos. Através do emprego de células relevantes, isto é, provenientes do sítio

de colonização ou infecção, é possível identificar o fenômeno de aderência e relacioná-la ao processo infeccioso. Portanto, o ideal é que as propriedades adesivas sejam testadas com cepas isoladas do paciente em relação às suas próprias células. Porém, há variação na capacidade receptiva de células epiteliais de um mesmo indivíduo em amostragens obtidas em tempos diferentes (EDÉN, 1986). Quando são utilizadas células do próprio hospedeiro, normalmente, são obtidas células uroepiteliais de sedimento urinário ou células do epitélio vaginal ou periuretral coletadas por raspagem. Também podem ser utilizadas células epiteliais da mucosa bucal (GIBBONS; HOUTE, 1975; SANDBERG; STENQVIST; SVANBORG-EDÉN, 1979; OFEK; MOSEK; SHARON, 1981; REID; BROOKS; BACON, 1983).

As taxas de adesão bacteriana, via manose-sensível, obtidas em ensaios que empregam células uroepiteliais de sedimento urinário, devem ser analisadas com cuidado. Frequentemente essa aderência tem sido atribuída à ligação bacteriana aos resíduos de manose da proteína de TAMM-HORSFALL (CHICK et al., 1981). A vantagem de se empregar linhagens celulares em condições de cultivo para o estudo da aderência bacteriana reside no fato de não haver interferência de variações fisiológicas, que ocorrem quando se utilizam células do próprio hospedeiro. Dessa forma, têm sido realizados trabalhos utilizando células HeLa, células HEp-2 e linhagem celular “Intestine 407” (VOSBECK et al., 1979; VOSBECK; HANDSCHIN; MENGE, 1979; SUGARMAN; EPPS; STENBACK, 1983; SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984; ALBERT et al., 1991).

3.12.2 Hemaglutinação e Aglutinação com Partículas de Látex

Métodos que diferenciam cepas bacterianas, de acordo com a especificidade de seus receptores, podem utilizar eritrócitos de diferentes espécies animais (DUGUID; CLEGG; WILSON, 1979), eritrócitos recobertos com o receptor em estudo (KÄLLENIUS et al., 1981) ou células leveduriformes (EISENSTEIN; OFEK; BEACHEY, 1979). Quando disponíveis, são usadas partículas de látex recobertas com o receptor, como o “P-partícula específica para teste de aglutinação” (PPA test), um

ensaio que identifica a expressão da fimbria P em cepas uropatogênicas de *E. coli* (MÖLLBY et al., 1983).

3.13 RECEPTORES ESPECÍFICOS PARA HEMAGLUTININAS BACTERIANAS

EDÉN (1986) cita as seguintes metodologias para caracterização de adesinas dentro de um grupo de isolados clínicos:

a) hemaglutinação com eritrócitos humanos e de cobaia na presença e na ausência de D-manose:

-esses testes resultam em dois padrões de hemaglutinação, sendo que o padrão MS designa cepas hemaglutinantes sensíveis à presença de manose, enquanto que cepas MR são aquelas cuja propriedade hemaglutinante não é afetada pela presença de manose, conforme demonstrado na tabela 1, p.34, cada cepa bacteriana é descrita por símbolos baseando-se na reatividade em relação às duas diferentes espécies de eritrócitos: MR MS; MR-; MS MS; - MS; MR MR; - -;

b) hemaglutinação com eritrócitos humanos P₁ e p (defectivos):

-a tabela 2, p.35, demonstra como a especificidade do receptor de cepas MR pode ser analisada reagindo-se as cepas bacterianas com eritrócitos humanos P₁ e p: cepas portadoras unicamente de adesinas específicas para a ligação com receptores que apresentam a região Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β aglutinam somente eritrócitos P₁; cepas que expressam simultaneamente adesinas para receptores Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β e outras adesinas com especificidade X, ou somente adesinas X aglutinam ambos os tipos de eritrócitos;

c) aglutinação com partículas de látex ou com eritrócitos recobertos com receptor.

TABELA 1 – RECEPTORES ESPECÍFICOS PARA ADESINAS BACTERIANAS

ADESINAS	ERITRÓCITOS HUMANOS		ERITRÓCITOS DE COBAIA		LEVEDURAS
	Sem manose	Com manose	Sem manose	Com manose	
MR- ⁽¹⁾	+	+	—	—	—
MRMS ⁽²⁾	+	+	+	—	+
MRMR ⁽³⁾	+	+	+	+	—
MSMS ⁽⁴⁾	+	—	+	—	+
-MS ⁽⁵⁾	—	—	+	—	+
-- ⁽⁶⁾	—	—	—	—	—

FONTE: EDÉN, C. S. Bacterial adherence in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Scand. J. Urol. Nephrol.* Sweden, v. 20, p. 81-88, 1986.

NOTAS: MR: Manose-resistente.

MS: Manose-sensível.

+ : Aglutinação.

— : Ausência de aglutinação.

(1) Cepas MR – : aglutinam somente eritrócitos humanos sem sofrerem a interferência da manose.

(2) Cepas MRMS: possuem os dois tipos de adesinas: a adesina MR, que aglutina eritrócitos humanos independente da presença de manose e a adesina MS que aglutina eritrócitos de cobaia e leveduras na ausência de manose.

(3) Cepas MRMR: possuem adesinas MR específicas para eritrócitos humanos e adesinas com especificidade X, que podem aglutinar tanto eritrócitos humanos quanto de cobaia.

(4) Cepas MSMS: possuem adesinas MS específicas para eritrócitos de cobaia e adesinas heterogêneas, que também aglutinam eritrócitos humanos e leveduras na ausência de manose.

(5) Cepas -MS: possuem apenas adesinas MS que aglutinam eritrócitos de cobaia e leveduras.

(6) Cepas -- : não possuem adesinas detectáveis por esse método.

TABELA 2 – IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR ESPECÍFICO PARA ADESINA MANOSE-RESISTENTE

ADESINAS	HEMAGLUTINAÇÃO ERITRÓCITOS HUMANOS		LÁTEX COM RECEPTOR PARA Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal β
	P ₁	p	
Fímbria P	+	—	+
X adesinas	+	+	—
Ambas	+	+	+

FONTE: EDÉN, C. S. Bacterial adherence in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Scand. J. Urol. Nephrol.* Sweden, v. 20, p. 81-88, 1986.

NOTAS: Sinais utilizados:

+ Aglutinação.

— Ausência de aglutinação.

3.14 OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA EM *E. coli* UROPATOGÊNICA

Além da expressão de diferentes adesinas e hemaglutininas, a produção de outros produtos incrementa o potencial de virulência bacteriano: hemolisinas, fator necrotizante citotóxico 1 (CNF-1), aerobactina, resistência ao soro e síntese de lipopolissacárides (DONNENBERG; WELCH, 1996; SVANBORG; GODALY, 1997). Considerando que as infecções ocorrem por um distúrbio no relacionamento entre o organismo do hospedeiro e o hóspede, torna-se importante estabelecer como esses múltiplos fatores de virulência atuam em conjunto. Em hospedeiros imunocomprometidos bactérias com baixo potencial de virulência podem causar infecção, enquanto que, em indivíduos saudáveis, a bactéria requer um conjunto de fatores de virulência. Dessa forma, o hóspede é sempre o fator determinante para a suscetibilidade à infecção (KUNIN, 1991).

TULLUS et al. (1991) realizaram um estudo epidemiológico comparando 115

cepas de *E. coli* isoladas de crianças e mulheres com pielonefrite aguda com 96 cepas de *E. coli* isoladas da microbiota intestinal. Nesse estudo as cepas pielonefritogênicas expressaram com mais frequência os seguintes fatores de virulência: fímbria P, superfície celular hidrofóbica, capacidade hemaglutinante manose-resistente, síntese de hemolisina, produção de CNF-1 e de aerobactina.

3.14.1 Produção de Hemolisina

As hemolisinas são proteínas citotóxicas detectadas por sua capacidade em lisar eritrócitos. Apresentam-se *in vitro* tóxicas para outros tipos de células, como leucócitos polimorfonucleares e monócitos humanos. Podem ser codificadas por genes cromossômicos ou por genes plasmidiais. Há uma associação entre pielonefrite causada por *E. coli* produtora de hemolisina e baixos níveis séricos de hemoglobina no paciente. Aparentemente, a hemolisina produzida por cepas uropatogênicas de *E. coli* também pode causar injúria em células dos túbulos renais (SVANBORG; GODALY, 1997).

A hemolisina produzida por cepas de *E. coli* faz parte de uma família de toxinas citolíticas conhecidas como RTX. Trata-se de uma proteína acetilada formada por 1.023 aminoácidos e que apresenta sítio de ligação para o cálcio. O produto final possui peso molecular variando entre 300 a 1.000 kDa, sendo excretado extracelularmente sem clivagem amino-terminal. Ainda não se conhecem possíveis receptores de membrana para as toxinas RTX. As toxinas RTX atuam sobre uma grande variedade de células-alvo específicas. A formação de poro na membrana celular é o mecanismo postulado para a atividade citolítica dessas toxinas. Esses poros são, presumivelmente, estruturas protéicas alinhadas na forma de canal. A evidência da formação de poro origina-se primariamente de experimentos com proteção osmótica. As premissas teóricas para a proteção osmótica consistem no fato de que soluto com diâmetro molecular maior que o tamanho do poro previne lise celular e que solutos compostos por moléculas menores passam através dos poros, resultando em um gradiente osmótico. Há influxo de água e de íons Ca^{2+} para dentro da célula e efluxo

de íons K^+ , gerando dilatação celular e conseqüente lise osmótica. A transição a partir de um estado de pouca proteção contra a lise conferida por um pequeno soluto para a proteção total por um grande soluto constitui a estratégia usada para definir o diâmetro do poro. Experimentos de proteção osmótica de eritrócitos por dextran-4 permitiram prever um diâmetro de 2 a 3 nm para o poro induzido pela hemolisina de cepas de *E. coli*. Fatores como o tempo de ação, a concentração da hemolisina e a temperatura atuam no tamanho do poro sugerindo que, inicialmente, a hemolisina gera uma lesão pequena que aumenta de tamanho ao longo do tempo (MOAYERI; WELCH, 1994).

3.14.2 Antígenos Estruturais em Cepas de *E. coli*

Os três determinantes para a classificação de cepas de *E. coli* são o antígeno O ou somático de natureza lipopolissacáride, o antígeno K ou capsular de natureza polissacáride e o antígeno H ou flagelar de natureza protéica. O antígeno O determina o sorogrupo de uma cepa, enquanto que a definição do seu sorotipo requer a identificação dos três tipos antigênicos. Dessa forma, a pesquisa do sorotipo de cepas de *E. coli* é um processo que envolve o uso de vários anti-soros que permitem determinar 173 antígenos O, 80 antígenos K e 56 tipos de antígenos H. Estima-se que existam 50.000 diferentes sorotipos de *E. coli*, porém, somente um número limitado está envolvido em infecções humanas (DONNENBERG; WELCH, 1996).

Os seguintes sorotipos de *E. coli* são expressos com maior freqüência em cepas de *E. coli* pielonefritogênicas: O1K1H7, O1K1H-, O4K12H1, O4K12H-, O6K2HN, O7K1H-, O16K1H6, O18K5H-, O75K5H5 e O75K5H- (SVANBORG; GODALY, 1997).

O lipopolissacáride (LPS) de uma bactéria Gram-negativa consiste de repetidas unidades de polissacárides ligadas ao lipídio A, que ancora a molécula na membrana externa bacteriana. O lipopolissacáride define a superfície externa da bactéria, sendo que a falta de unidades polissacarídicas incrementa a hidrofobicidade e confere à bactéria morfologia colonial rugosa e propriedades auto-aglutinantes. Em comparação com as bactérias que formam colônias lisas, os mutantes rugosos são mais suscetíveis

à lise mediada por complemento. Isolados clínicos de *E. coli* demonstram variabilidade no fenótipo do LPS, com estágios intermediários entre colônias lisas e rugosas (SVANBORG; GODALY, 1997). O lipídeo A possui propriedades tóxicas, inflamatórias e imunomoduladoras. Muitos sintomas de septicemia por bactérias Gram-negativas podem ser reproduzidos em animais de laboratório por administração de LPS ou somente do lipídeo A. O LPS liga-se às células do hospedeiro que albergam o receptor CD-14 e desencadeia uma resposta inflamatória. Por enquanto, não está clara qual a extensão da resposta induzida pelo LPS nas células uroepiteliais de pacientes com infecção urinária. Sabe-se que, no estágio agudo da infecção urinária, os sintomas podem ser causados, em parte, pela ação do LPS sobre a superfície mucosa (SVANBORG; GODALY, 1997).

Os antígenos K são polissacárides ácidos que agem formando um envoltório capsular bacteriano que restringe o acesso do complemento e o processo de fagocitose. São produzidos por muitas cepas de *E. coli* envolvidas em infecções extra-intestinais. Cepas uropatogênicas encapsuladas apresentam uma vantagem significativa na resistência à fagocitose *in vivo* e, dessa forma, persistem no trato urinário por mais tempo, quando comparadas com mutantes deficientes em cápsulas. Os antígenos K1, K2, K5, K12, K13 E K15 são expressos em altos níveis entre cepas de *E. coli* causadoras de pielonefrite aguda (SVANBORG; GODALY, 1997).

O antígeno H é o determinante da estrutura da flagelina, proteína que compõe o flagelo. Nem todas as cepas de *E. coli* são móveis e produzem flagelo (DONNENBERG; WELCH, 1996).

3.15 PROFILAXIA ANTIMICROBIANA E INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

O uso profilático de agentes antimicrobianos para a prevenção de infecções do trato urinário é um recurso que pode ser utilizado em casos especiais. A relação de risco-benefício da terapia prolongada, considerando custo, efeitos colaterais e indução de resistência bacteriana, ainda não apresenta critérios completamente avaliados. Pacientes com injúria espinhal, crianças com refluxo vesicoureteral, mulheres com

infecções urinárias recorrentes, transplantados renais, imunossuprimidos em geral, constituem exemplos de casos em que a terapia profilática antimicrobiana apresenta efeitos benéficos (MOBLEY; WARREN, 1996). A terapia profilática consiste na administração de doses subterapêuticas diárias (ou três vezes por semana) de um agente antimicrobiano efetivo no tratamento de infecções do trato urinário. Recomenda-se que o paciente ingira a medicação à hora de deitar de modo que a incubação noturna na urina vesical permita contato prolongado entre a droga e a bactéria, afetando as taxas de multiplicação e prevenindo a aderência bacteriana ao uroepitélio (KUNIN, 1991).

ZAK e KRADOLFER (1979) estudaram os efeitos de concentrações subinibitórias de antibióticos em infecções experimentais de ratos e coelhos. Em infecções produzidas por *E. coli* e *Proteus mirabilis*, a administração de doses subinibitórias de antibióticos beta-lactâmicos e de gentamicina prolongou as taxas de sobrevivência dos animais infectados. Há alguns efeitos produzidos por doses subinibitórias de antimicrobianos *in vitro*, como retardo no processo de proliferação bacteriana, incremento da suscetibilidade à fagocitose e decréscimo na capacidade adesiva. Possivelmente, esses efeitos também ocorrem *in vivo* e influenciam o curso de uma infecção. Baixos níveis de agentes antimicrobianos na urina ou no fluido vaginal, obtidos por profilaxia de doses reduzidas, constituem uma forma eficiente de se prevenir a colonização bacteriana periuretral e a bacteriúria em mulheres com infecções recorrentes do trato urinário (OFEK et al., 1979; VOSBECK et al., 1982; BRAGA; PIATTI, 1992; BREINES; BURNHAM, 1994). Os antibióticos mais empregados em terapias profiláticas para infecções do trato urinário são o trimetoprim, o trimetoprim-sulfametoxazol, a nitrofurantoína e as fluorquinolonas. Embora a nitrofurantoína selecione menor número de cepas resistentes da microbiota intestinal, o seu emprego restringe-se devido ao aparecimento de efeitos colaterais que requerem a cessação do tratamento. Regimes terapêuticos profiláticos incluindo outros agentes antimicrobianos, como os β -lactâmicos, são mais toleráveis pelos pacientes, mas alteram drasticamente a microbiota intestinal e vaginal (STAPLETON, 1999). Há que se avaliar o considerável aumento de cepas de *E. coli* resistentes a fluorquinolonas nos

últimos cinco anos devido aos abusos de indicação dessa droga. No entanto, constitui uma alternativa terapêutica para pacientes que apresentam alergia à penicilina e seus derivados ou a sulfas (SONSTEIN; BURNHAM, 1993; BLÁZQUEZ et al., 1999).

A considerável morbidade e mortalidade causada por infecções do trato urinário em transplantados renais também justifica o uso de terapias profiláticas prolongadas à base de trimetoprim-sulfametoxazol ou de fluorquinolonas. Embora a profilaxia antimicrobiana registre alguma melhora clínica por algum tempo, de modo geral, não tem efeito na história natural de infecções recorrentes, servindo apenas como agente paliativo. Porém, principalmente em pacientes imunocomprometidos, esse efeito temporário pode representar considerável aumento na qualidade de vida do paciente e até mesmo garantir a sua sobrevivência (RUBIN; RUBIN, 1997).

3.16 PERSPECTIVAS EM IMUNOTERAPIA PARA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

Novas estratégias alternativas para o tratamento ou prevenção de infecções do trato urinário estão sendo pesquisadas com o intuito de substituir a terapia antimicrobiana ou atuar sinergicamente com essa. Estudos moleculares sobre a interação “parasita-hospedeiro” têm permitido compreender esse mecanismo e desenvolver substâncias que competem com os sítios de ligação bacteriana existentes nas superfícies mucosas do trato urogenital (STAPLETON, 1999).

Pesquisas *in vitro* demonstram que a adição de um receptor análogo ao encontrado na superfície de células uroepiteliais previne a adesão de cepa de *E. coli* uropatogênica a essas células. Da mesma forma, o pré-tratamento de cepas uropatogênicas de *E. coli* com receptor oligossacarídeo solúvel também resulta no bloqueio da adesão bacteriana a células epiteliais (EDÉN, 1986; ROBERTS et al., 1994).

Uma terapia viável na Europa desde a década de oitenta consiste na administração ao paciente, na forma de supositórios vaginais, de um coquetel

composto de células mortas de bactérias uropatogênicas. Espera-se, desse modo, que os antígenos bacterianos se difundam através do trato geniturinário e desencadeiem a produção de anticorpos da classe secretora IgA, os quais circulam nas superfícies mucosas do trato urinário e reprodutivo, combatendo a invasão bacteriana. Apesar de apresentar efeito protetor, esse medicamento tem seu uso limitado devido ao pouco tempo de ação, requerendo a administração de novas doses em intervalos de poucos meses (SERVICE, 1997).

Outra linha de pesquisa procura desenvolver uma vacina que tem por alvo a molécula de adesão FimH. A administração da proteína bacteriana FimH, obtida por engenharia genética, evita a exposição do paciente a todo o microrganismo e aos efeitos colaterais de toxinas bacterianas. Quando injetada a vacina no hospedeiro, composta por moléculas de Fim-H, ocorre estímulo do sistema imunológico e produção de anticorpos que bloqueiam a propriedade adesiva bacteriana (SERVICE, 1997).

Uma vacina eficaz contra pielonefrite deve possuir elementos que promovam a formação de anticorpos contra os componentes da fimbria P. ROBERTS et al. (1994) demonstraram que um mutante defectivo na produção de PapG, construído a partir de uma cepa de *E. coli* pielonefritogênica, não foi capaz de causar pielonefrite ou outros danos renais em macacos. Por outro lado, a imunização prévia de ratos e macacos com anticorpos antifimbria P mostrou ação protetora contra pielonefrite causada por *E. coli* P fimbriada. Os autores sugerem que uma vacina composta de proteína PapG poderia ser eficaz no combate à pielonefrite em humanos. Considerando que a variação de seqüência gênica da molécula de PapG entre diferentes cepas de *E. coli* pielonefritogênicas é baixa, uma resposta imune direcionada apenas para uma variante de PapG teria ação contra todos os outros sorotipos de *E. coli* P fimbriadas.

JIAN e FUSCO (2000) confirmaram as considerações de ROBERTS et al. (1994) ao testarem a inibição de ligação do sorotipo F7₁ de pilus P a eritrócitos humanos por ação de um anti-soro pilus-específico obtido de coelho. Adicionalmente, outros anti-soros piliares homólogos e heterólogos foram testados e todos foram

capazes de inibir a hemaglutinação do sorotipo F7₁. Esses autores concluem que vacinas compostas por componentes purificados do pilus P podem desencadear a produção de anticorpos que agem bloqueando a ligação bacteriana às células do hospedeiro, independente do tipo de adesina expressada pela cepa de *E. coli* P fimbriada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 30 cepas de *E. coli* obtidas de cultura de urina de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) com sintomas de infecção urinária. As uroculturas selecionadas apresentaram desenvolvimento de apenas uma espécie bacteriana em concentrações iguais ou superiores a 100.000 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) /mL.

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *E. coli*

As amostras de urina foram colhidas e processadas conforme recomendações de MURRAY et al. (1999), que orienta coletar em frasco estéril o jato urinário médio proveniente da primeira micção matinal, após cuidadosa assepsia dos genitais externos. As urinas foram semeadas em ágar cistina-lactose eletrólito deficiente (CLED) (MERCK), com alça bacteriológica calibrada para dispensação de 0.001 mL de urina. As placas de cultivo foram incubadas por 18 horas, a 37° C, sob condições aeróbias. Após esse período, o crescimento bacteriano foi quantificado em UFC/mL de acordo com o número de colônias desenvolvidas. As cepas foram identificadas bioquimicamente e submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana, através do sistema automatizado WalkAway-96 - Microscan (Dade Behring - USA), que fornece o resultado da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em caldo, segundo as normas americanas preconizadas pelo “Comitê Nacional de Padronização para Laboratórios Clínicos” (NCCLS, 2000). Esse sistema automatizado trabalha com bandejas individuais divididas em compartimentos, os quais contêm vários substratos e diferentes concentrações de antimicrobianos. A cada bandeja é adicionada uma suspensão bacteriana de forma a preencher todos os compartimentos. A bandeja é incubada no aparelho a 37° C por 18 horas, tempo suficiente para que ocorram as

reações bioquímicas de identificação e para que se defina o perfil de suscetibilidade antimicrobiana para cada isolado clínico. Durante esse período automaticamente são dispensados dentro das cavidades reativos que permitem detectar se houve alteração do substrato por ação bacteriana.

Quanto ao teste de suscetibilidade antimicrobiana, o desenvolvimento bacteriano provoca turvação do meio, indicando resistência bacteriana, enquanto que cepas sensíveis não se desenvolvem e o meio permanece límpido. O aparelho realiza leituras espectrofotométricas das bandejas e através de um programa que estabelece um valor numérico para cada prova bioquímica é gerado um número que indica a maior probabilidade de determinado gênero e espécie bacteriana. Quando esta probabilidade atinge porcentagens de acerto superiores a 98%, presuntivamente, o aparelho identifica a cepa bacteriana em estudo. Quando essa porcentagem é inferior a esse valor, o aparelho indica quais provas bioquímicas complementares serão necessárias para a identificação da cepa em estudo.

4.2 REGISTRO DE DADOS

As cepas de *E. coli* foram registradas em formulário próprio, contendo os seguintes dados: número de identificação da amostra, registro geral do paciente no HC, data de coleta, sexo, clínica de atendimento, indicação clínica e as concentrações inibitórias mínimas para os seguintes antibióticos: norfloxacina, ampicilina, gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprim, além da classificação na categoria de sensível, intermediário ou resistente.

4.3 MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *E. coli*

As cepas bacterianas foram repicadas para ágar soja tripticaseína (TSA) e incubadas por 16 a 18 horas a 37° C, sob condições aeróbias. A seguir, o meio de cultivo foi mantido sob refrigeração (4 - 6° C) e a cepa bacteriana foi repicada semanalmente. Para períodos mais longos (até dois meses) as cepas foram mantidas

em 3 mL de caldo de soja tripticaseína (TSB) acrescentado de glicerol em partes iguais e armazenadas a -70°C (NCCLS, 1997).

4.4 PESQUISA DE HEMAGLUTININAS MANOSE-RESISTENTES E MANOSE-SENSÍVEIS

Para controle das reações utilizou-se a cepa portadora de fimbria tipo 1 – ORN115 (ORNDORFF et al., 1985), a cepa portadora da fimbria tipo P – EH824 (RHEN et al., 1983; KORHONEN et al., 1990) e a cepa afimbriada K12. Com o intuito de se empregar a técnica mais eficaz para o estudo de aglutininas bacterianas e devido à carência de dados a esse respeito em nosso meio, foram testadas várias técnicas anteriormente descritas por pesquisadores dessa área. Os ensaios relatados, tanto para a pesquisa de hemaglutininas quanto de adesinas, foram realizados em triplicata.

4.4.1 Suspensão Bacteriana

Com o propósito de se pesquisar a presença de adesinas manose-resistentes e para evitar a interferência da fimbria tipo 1, as cepas de *E. coli* foram inicialmente cultivadas em ágar de infuso de cérebro e coração de boi (ágar - BHI) por 24 horas a 37°C , sendo que esse meio de cultura proporciona o máximo de expressão de adesinas manose-resistentes. Para garantir o máximo de expressão da fimbria P foram seguidas as recomendações de ABALIA et al. (1997). As cepas bacterianas foram cultivadas inicialmente em 5 mL de caldo Mueller-Hinton (MH) por cinco dias a 37°C , sob condições estáticas e, em seguida subcultivadas em ágar fator adesivo de colonização (CFA: 1% de ácido casamino; 0,15% de extrato de levedura; 0,05% de sulfato de magnésio; 0,0005% de cloreto de manganês; 2% de ágar; pH 7,4) (ANDREU et al., 1997), por 24 horas a 36°C .

A partir do crescimento em ágar BHI e ágar CFA foram preparadas suspensões bacterianas distintas, com aproximadamente 10^{11} UFC/mL em tampão fosfato em

solução salina (PBS) , pH 7,2, contendo D-manose a 3% e em PBS sem D-manose (VÄISÄNEM; LOUNATMAA; KORHONEN, 1982).

Para pesquisa de adesinas manose-resistentes pertencentes ao grupo X, as bactérias foram semeadas em ágar BHI por 24 horas a 37° C, sob condições estáticas, e a partir do desenvolvimento nesse meio foram feitas suspensões bacterianas com aproximadamente 10^{11} UFC/mL em PBS, pH 7,2, com D-manose a 3%. Para favorecer ao máximo a expressão da fimbria tipo 1, as cepas bacterianas foram semeadas em caldo BHI (MERCK) por 48 horas a 37° C, sob condições estáticas. Foram feitas as seguintes suspensões bacterianas: suspensões com aproximadamente 10^9 UFC/mL em PBS, pH 7,2, sem D-manose; suspensões com aproximadamente 10^9 UFC/mL em PBS, pH 7,2, com D-manose a 3% (PARRY et al., 1983).

A densidade das suspensões bacterianas foi ajustada segundo a escala nefelométrica de McFARLAND, que consiste em uma série de tubos contendo suspensões de sulfato de bário (Ba_2SO_4) de turvação crescente. Para concentrações de aproximadamente 10^9 UFC/mL utilizou-se como padrão um ponto acima do tubo n.º 10 da escala de McFARLAND, que foi obtido misturando-se 2 mL de cloreto de bário ($BaCl_2$) a 1% com 8 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1%, a reação originou uma suspensão de Ba_2SO_4 com turvação correspondente a aproximadamente $6,0 \times 10^9$ UFC/mL. A aferição dessas suspensões bacterianas em relação à turvação padrão foi realizada em espectrofotômetro, tendo como parâmetro de comparação uma média de densidade ótica entre 1.155 a 1.222, em filtro de 550 nm (LENNETTE; SPAULDING; TRUANT, 1974; EISENSTEIN; OFEK; BEACHEY, 1979; FINEGOLD; BARON, 1991). As suspensões bacterianas de aproximadamente 10^{11} UFC/mL foram aferidas através de culturas quantitativas em ágar CLED.

4.4.2 Suspensão de Eritrócitos

Foram gentilmente fornecidas pelo Hemocentro do Estado do Paraná (Hemepar) as seguintes amostras de sangue citratado de doadores: grupo O, Rh positivo, antígeno P_1 positivo; sangue O, Rh positivo com fenótipo p negativo; sangue

do grupo A, Rh positivo, antígeno P₁ positivo e sangue de doadores do grupo A, Rh positivo, mas com fenótipo p negativo. Puncionaram-se cobaias do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR para obtenção de aproximadamente 2 mL de sangue heparinizado.

Os diferentes tipos de amostras de sangue foram divididos em volumes iguais e processados da seguinte forma: uma parte do volume foi lavada três vezes com PBS, pH 7,2, contendo D-manose a 3% e as hemácias suspensas a 2,5% em PBS, pH 7,2, contendo D-manose a 3%; e o restante foi lavado três vezes com PBS, pH 7,2, sem D-manose e as hemácias suspensas a 2,5% em PBS, pH 7,2, sem D-manose (PARRY et al., 1983).

4.4.3 Detecção de Hemaglutinação Manose-resistente

Depositou-se sobre uma lâmina de vidro 25 µL da suspensão bacteriana com aproximadamente 10¹¹ UFC/mL em PBS, pH 7,2, sem D-manose e 25 µL da suspensão de eritrócitos humanos O, Rh positivos, P₁ positivos a 2,5% em PBS, pH 7,2, sem D-manose. A lâmina foi assentada sobre gelo moído e rotada manualmente por 2 minutos (DUGUID; CLEGG; WILSON, 1978). As cepas que hemaglutinaram foram submetidas a procedimento idêntico ao anteriormente descrito, porém, foram suspensas em PBS, pH 7,2, com D-manose a 3% e reagidas com suspensão de eritrócitos humanos a 2,5% em PBS, pH 7,2, com D-manose a 3%. Esse procedimento foi realizado com as cepas desenvolvidas em ágar BHI e com as cepas desenvolvidas em ágar CFA. As cepas que hemaglutinaram na presença de D-manose foram classificadas como manose-resistentes (MRHA). As cepas de *E. coli* MRHA foram testadas frente à suspensão de eritrócitos humanos p defectivos a 2,5% em PBS, pH 7,2, com D-manose a 3%.

A presença de hemaglutinação com eritrócitos p defectivos indicou a presença de adesinas X. Utilizando a mesma técnica, o teste também foi realizado frente a eritrócitos humanos tipo A, Rh positivos e antígeno P₁ positivos. O controle das reações de hemaglutinação com suspensões de eritrócitos P₁ e com eritrócitos p

defectivos foi realizado reagindo-se as suspensões de eritrócitos com PBS, pH 7,2, sem D-manose e com PBS, pH 7,2, com 3% de D-manose, em condições idênticas às do teste. A ausência de hemaglutinação validou o teste (ANDREU et al., 1997). Outra técnica alternativa testada foi a de DUGUID, CLEGG e WILSON (1979) que preconizam raspar com alça bacteriológica o crescimento bacteriano confluyente da superfície do ágar e emulsioná-lo diretamente em suspensão de eritrócitos humanos a 2,5% em PBS, pH 7,2, com D-manose a 3%.

Preparou-se uma reação positiva e uma reação negativa de hemaglutinação sobre lâmina, secou-se ao ar e procedeu-se à coloração com corante de Giemsa diluído 1:10 em tampão de Sörensen, pH 7,3, por 12 minutos. Após as lâminas estarem secas, depositou-se uma gota de fluido de montagem (Permount – Fisher – Scientific - USA) sobre as preparações e cobriu-se com lamínulas. A análise foi realizada em microscópio de luz empregando-se aumento de 1.000 vezes.

4.4.4 Detecção de Hemaglutinação Manose-sensível

Foram depositados sobre uma lâmina de vidro 25 μ L de suspensão bacteriana com aproximadamente 10^9 UFC/mL em PBS, pH 7,2, sem D-manose e 25 μ L de suspensão de eritrócitos de cobaia a 2,5% em PBS, pH 7,2, sem D-manose. A lâmina foi rotada manualmente por 2 minutos à temperatura ambiente. Empregando a mesma técnica, as cepas bacterianas que apresentaram aglutinação foram suspensas em PBS, pH 7,2, com D-manose a 3% e testadas com suspensão de eritrócitos de cobaia a 2,5% em PBS, pH 7,2, contendo D-manose a 3%. As cepas bacterianas cuja hemaglutinação com eritrócitos de cobaia foi inibida na presença de D-manose foram classificadas como cepas MSHA. Para controlar o fenômeno de auto-aglutinação, a suspensão de eritrócitos de cobaia foi reagida com PBS, pH 7,2, sem D-manose e com D-manose a 3%, sob condições idênticas à do teste. A ausência de hemaglutinação validou o teste (HAGBERG et al., 1981).

Para complementar a pesquisa de cepas de *E. coli* MS foi empregada a técnica alternativa citada por DUGUID, CLEGG e WILSON (1979), na qual mistura-se em

lâmina de vidro 25 μL do cultivo bacteriano de 48 horas em caldo BHI a 37° C, sob condições estáticas, com 25 μL de PBS, pH 7,2, com D-manose a 3% e, em seguida, agrega-se mais 25 μL de suspensão de eritrócitos de cobaia a 2,5% em PBS, pH 7,2, sem D-manose. A lâmina é rotada manualmente por 2 minutos e observa-se a reação de inibição de hemaglutinação. A pesquisa de hemaglutininas manose-sensíveis foi confirmada misturando-se em lâmina de vidro 25 μL da suspensão bacteriana (aproximadamente 10^9 UFC/mL) em PBS, pH 7,2, sem D-manose e 25 μL de uma suspensão de leveduras. Para tanto, utilizou-se uma cepa controle de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em ágar Sabouraud por 48 horas a 30° C, após esse período, as células leveduriformes foram suspensas em PBS, pH 7,2, sem D-manose à concentração aproximada de 10^9 UFC/mL, que foi ajustada visualmente comparando-se com o tubo 9 da escala nefelométrica de McFARLAND. A mistura foi rotada por 2 minutos, à temperatura ambiente, e a formação de grumos brancos foi indicativa de reação positiva. As cepas aglutinantes foram testadas, seguindo a mesma metodologia, com suspensão de leveduras em PBS, pH 7,2 contendo D-manose a 3%. A ausência de aglutinação nessa fase confirmou as cepas MSHA. O controle da reação foi feito reagindo-se 25 μL da suspensão de leveduras com 25 μL de PBS, pH 7,2, com e sem D-manose, sob condições idênticas às do ensaio. A ausência de aglutinação validou o teste (HAGBERG et al., 1981).

Preparou-se em lâmina uma reação positiva de aglutinação com leveduras e uma reação negativa. Os esfregaços foram secados ao ar e corados pela coloração de Gram (violeta de genciana a 1% – 1minuto; lugol – 1minuto; álcool-acetona – 3 segundos; lavar com água; fucsina básica – 15 segundos; lavar com água). As lâminas secas foram montadas com fluido de montagem e lamínulas. A análise foi realizada em microscópio de luz empregando-se o aumento de 1.000 vezes.

4.5 DETECÇÃO DE HEMOLISINAS

As cepas bacterianas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Columbia (MERCK), suplementado com 5% de sangue de carneiro, e incubadas por

16 a 18 horas a 37° C. Após esse período, as culturas foram observadas quanto à formação de um halo claro em volta das colônias, que é indicativo de hemólise (ANDREU et al., 1997).

4.6 PESQUISA DE ADERÊNCIA BACTERIANA A CÉLULAS HEp-2

Empregou-se a linhagem contínua de células HEp-2 que é derivada de carcinoma epidermóide de laringe e permite um número infinito de passagens em cultivos celulares *in vitro* (CARBALLAL; OUBIÑA, 1991). A metodologia utilizada no cultivo celular seguiu basicamente o recomendado por LENNETTE, LENNETTE e LENNETTE (1995). Foi usado o Meio Essencial Mínimo (MEM – Sigma – St. Louis – USA e Cultilab – Campinas – São Paulo – BR), pH 7,2, suplementado com soro fetal bovino a 10% e com tampão HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$ - Sigma – St. Louis – USA), 1 M, pH 7,3 - 7,4 a 1%. Ao MEM foi adicionado 1% de uma solução de antibióticos composta por penicilina G sódica ou potássica de 1.000.000 U em 100 mL de água bidestilada e sulfato de estreptomicina a 1%. Para prevenir a contaminação por fungos adicionou-se também 0,1% de solução de Anfotericina B a 0,1% em água bidestilada.

4.6.1 Manutenção da Linhagem Celular

A linhagem de células HEp-2 foi acondicionada em ampolas e mantida em meio de congelamento celular (90% de soro fetal bovino e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO [Sigma – St. Louis – USA]), a - 150° C em Nitrogênio líquido. O DMSO, além de baixar o ponto de congelamento, contribui para prevenir danos celulares causados por desnaturação de proteínas. O meio de congelamento foi preparado e mantido em banho de gelo durante o período de manipulação das células. À monocamada celular confluenta, cultivada em garrafa de cultivo celular com capacidade para 30 mL, adicionou-se 5 mL de uma solução composta por tripsina 1:250 (Sigma – St. Louis - USA) a 0,5% e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,2% diluídos em PBS, pH 7,2. Observou-se em microscópio invertido o momento do

desprendimento celular quando, então, a solução de tripsina e EDTA foi decantada e as células foram suspensas em 1 mL de soro fetal bovino (Laborclin – Curitiba–PR). Essa suspensão celular teve a sua concentração ajustada da seguinte forma: as células foram diluídas em azul de Trypan 0,1% nas concentrações de 1:20; 1:40; e 1:80, esse corante penetra nas células mortas corando-as de azul enquanto que as células vivas impedem a sua passagem e não são coradas (GEORGE; HIERTROLZER; ADES, 1996).

As diferentes diluições foram depositadas em hemocitômetro de Neubauer e contou-se o número de células viáveis nos quatro quadrantes externos da câmara e no retículo central. O número de células por mililitro foi calculado empregando-se a fórmula descrita por CAMPBELL e CAMPBELL (1986):

$$\text{N.º de células/mL} = \text{N.º de células contadas} \times 2 \times \text{fator de diluição} \times 1.000.$$

Após ajuste da concentração celular transferiu-se 1mL da suspensão celular, contendo aproximadamente 2×10^6 células /mL, para ampolas de polipropileno e adicionou-se 1mL de meio de congelamento (concentração final 1:2). As ampolas foram transferidas para recipiente contendo álcool isopropílico (C_3H_8O) (Cryo 1° C Freezing Cotainer -NALGENE™ - USA), que propicia um lento resfriamento, na ordem de $-1^\circ C$ a $-3^\circ C$ /minuto, de forma a permitir que a água do interior das células seja removida antes de seu congelamento. Assim acondicionadas, as ampolas foram colocadas em congelador a $-70^\circ C$ por 24 horas e, em seguida em recipiente contendo Nitrogênio líquido a $-150^\circ C$. Quando necessário, alíquotas de 1mL de células HEp-2 foram retiradas do Nitrogênio líquido, descongeladas parcialmente em banho-maria à temperatura entre 37 a $39^\circ C$ e, em seguida, transferidas para 10 mL de MEM com soro fetal bovino a 10%. Essa suspensão celular foi cultivada em garrafas de cultivo celular com capacidade para 30 mL por 48 horas a $37^\circ C$. Após esse cultivo inicial, a linhagem celular foi mantida nas garrafas de cultivo celular com MEM suplementado

com soro fetal bovino a 2%, sendo o meio de cultivo repostado diariamente ou quando ocorria variação visível de pH.

A linhagem celular HEp-2 se propaga rapidamente e, por isso, duas vezes por semana promoveu-se a dispersão celular e nova semeadura. Para tanto, obteve-se o desprendimento celular tratando o cultivo com 5 mL de solução de tripsina e EDTA, conforme descrito anteriormente. A solução de tripsina e EDTA foi desprezada e as células suspensas e homogeneizadas em 2 mL de MEM com 10% de soro fetal bovino. A suspensão celular foi diluída em PBS, pH 7,2, na proporção de 1:20. Essa diluição foi depositada em câmara de Neubauer e procedeu-se à contagem do número de células nos quatro quadrantes externos e no retículo central da câmara. O número de células por mililitro de MEM foi calculado, segundo fórmula descrita anteriormente, e o ajuste da concentração celular foi obtido variando-se a quantidade de MEM (aproximadamente $1,2 \times 10^5$ células/mL). Essa suspensão celular, devidamente ajustada, foi semeada em novos frascos de cultivo celular.

4.6.2 Preparo das Monocamadas Celulares

Alíquotas de 50 μ L de suspensão celular, contendo aproximadamente $1,2 \times 10^5$ células/mL, foram depositadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro contidas em placas de cultivo celular de 24 poços e incubadas por 15 a 30 minutos a 37° C. A seguir adicionou-se lentamente pelas paredes dos poços, mais 0,5 mL da mesma suspensão celular a cada um dos 24 poços da placa de cultivo celular. Esse procedimento assegurou uma ótima aderência das células às lamínulas. As placas de cultivo celular foram incubadas a 37° C por 48 a 36 horas, ou até se obter um crescimento celular semiconfluyente cobrindo as lamínulas (CARBONARE et al., 2000). Em período de incubação de 36 horas, no intervalo de 48 horas, o MEM foi retirado das cavidades e foi repostado meio fresco.

4.6.3 Preparo das Suspensões Bacterianas para o Teste de Aderência

Com o intuito de se obter o máximo de expressão das adesinas MS, as cepas de *E. coli* MSHA foram previamente cultivadas em caldo BHI a 37° C por 48 horas (DUGUID; CLEGG; WILSON, 1979). As cepas MRHA foram cultivadas a 37° C por cinco dias em caldo Mueller-Hinton e, em seguida repicadas para ágar CFA e incubadas por mais 24 horas a 37° C, procedimento que visa minorar a interferência das adesinas MS (ABALIA et al., 1997). Também foram testadas cepas MRHA cultivadas somente em ágar BHI a 37° C por 24 horas.

Com o objetivo de se promover a possível expressão de adesinas MS ou MR, que por ventura não foram detectadas pelo método de hemaglutinação empregado na primeira fase da pesquisa, as cepas de *E. coli* que não expressaram hemaglutininas foram novamente cultivadas em caldo BHI, caldo MH e ágar CFA, nas condições já descritas. A seguir as cepas de *E. coli* MSHA, as cepas MRHA e as cepas sem hemaglutininas foram suspensas em 5 mL de PBS, pH 7,2, nas seguintes concentrações: $7,0 \times 10^6$ UFC/mL; $3,0 \times 10^7$ UFC/mL e $6,0 \times 10^8$ UFC/mL. As concentrações dos inóculos bacterianos foram ajustadas espectrofotometricamente e através de culturas quantitativas em ágar CLED. As absorbâncias em comprimento de onda de 625 nm foram, aproximadamente, de 0,02 para a concentração de $7,0 \times 10^6$ UFC/mL; 0,04 para concentração de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL e 0,10 para $6,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para as culturas quantitativas, as suspensões bacterianas foram diluídas em PBS, pH 7,2, a 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000, as duas últimas diluições foram estriadas em placas de ágar CLED com alça bacteriológica de cromo-níquel calibrada para dispensar 1 µl de amostra. Após um período de incubação de 18 horas a 37° C contou-se o número de colônias de *E. coli* desenvolvidas no ágar CLED. Esse procedimento permitiu aferir o número de unidades formadoras de colônias por mililitro e também testou a viabilidade bacteriana das suspensões.

4.6.4 Período de Infecção das Monocamadas Celulares

Em paralelo, as monocamadas celulares formadas sobre as lamínulas foram lavadas por três vezes em PBS, pH 7,2 (5 minutos cada lavagem) e recobertas com 0,5 mL das respectivas suspensões bacterianas das cepas de *E. coli*. Em seguida foram incubadas por períodos de 1 hora, 2 horas, 2h30 e 3 horas a 37° C. Após o período de incubação, as suspensões bacterianas foram removidas e os poços da placa de cultivo foram lavados por três vezes com PBS, pH 7,2, para retirar as bactérias não aderentes (GOLUSZKO et al., 1997). O controle do procedimento foi realizado não inoculando a suspensão bacteriana em uma monocamada celular.

As monocamadas celulares foram fixadas por 5 minutos com fixador de Bouin (ácido pícrico - 28,40 mL; formaldeído - 9,4 mL; ácido acético - 1,8 mL) e lavadas duas vezes com etanol a 70%. O material fixado foi corado com corante de Giemsa diluído 1:20 em tampão fosfato de Sørensen M/30, pH 7,3, por 45 minutos. Procedeu-se à desidratação através da passagem das lamínulas por uma série de solventes orgânicos (acetona 1; acetona 2; duas partes de acetona mais uma parte de xilol; uma parte de acetona mais uma parte de xilol; uma parte de acetona mais duas partes de xilol; xilol 1; xilol 2). As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia com auxílio de óleo de montagem e secadas em estufa a 37° C por 72 horas.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz empregando-se aumento de 1.000 vezes, a capacidade adesivã para cada uma das 30 cepas de *E. coli* foi determinada contando-se o número de células bacterianas aderidas a cinquenta células eucarióticas e calculando-se a média (GOLUSZKO et al., 1997).

No prosseguimento da pesquisa adotou-se o inóculo padrão de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL e o tempo fixo de 3 horas (GOLUSZKO et al., 1997).

As cepas que apresentaram aderência semelhante ao padrão de aderência localizada foram submetidas à técnica descrita por SCALETSKY, SILVA e TRABULSI (1984), para confirmação de resultado. Nessa técnica a modificação principal consiste em adicionar primeiramente às monocamadas celulares 0,96 mL de MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, sem antibióticos e 0,04 mL da

suspensão bacteriana. Incuba-se por 30 minutos a 37° C (período infectante), lava-se em PBS, pH 7,2, por seis vezes cada poço da placa de cultivo, adiciona-se 1 mL de MEM, sem antibióticos, com 2% de soro fetal bovino a cada amostra e volta-se a incubar por mais 3 horas a 37° C (período de multiplicação). As lamínulas finalmente são lavadas por três vezes em PBS, pH 7,2, fixadas, coradas, desidratadas e montadas sobre lâminas de microscopia.

O teste de aderência bacteriana também foi realizado na presença de D-manose a 1%. Para tanto, após a dispersão celular com a solução de tripsina e EDTA, conforme descrito anteriormente, foram preparadas suspensões de células HEp-2 em MEM com 10% de soro fetal bovino e adicionado de D-manose a 1%. Essas suspensões celulares foram ajustadas em hemocitômetro de Neubauer à concentração próxima de $1,2 \times 10^5$ células/mL e dispensadas sobre lamínulas dentro dos poços das placas de cultivo celular. Após 48 horas a 37° C as monocamadas celulares foram lavadas por três vezes em PBS, pH 7,2, com D-manose a 1%. As suspensões bacterianas ($3,0 \times 10^7$ UFC/mL) foram preparadas em PBS, pH 7,2, com D-manose a 1%, dispensadas sobre as monocamadas celulares (0,5 mL) e incubadas a 37° C por 3 horas. A seguir as lamínulas foram lavadas três vezes em PBS, pH 7,2, fixadas, coradas, desidratadas e montadas sobre lâminas de microscopia.

5 RESULTADOS

5.1 PESQUISA DE HEMAGLUTININAS

Foram encontrados três padrões de hemaglutinação nas 30 cepas analisadas:

1 – aglutinação manose-sensível de eritrócitos de cobaia expressada isoladamente; 2 – aglutinação manose-sensível de eritrócitos de cobaia em associação com aglutinação manose-resistente de eritrócitos humanos grupo O ou grupo A, ambos Rh positivos e antígeno P₁ positivos; 3 – aglutinação manose-resistente de eritrócitos humanos grupo O ou grupo A, ambos Rh positivos e antígeno P₁ positivos, expressada isoladamente. A tabela 3, p.57, mostra o resultado dos testes para pesquisa de hemaglutininas com eritrócitos humanos, eritrócitos de cobaia e células de *Saccharomyces cerevisiae* na ausência e na presença de D-manose.

Entre as variações técnicas empregadas para pesquisa de hemaglutininas bacterianas (MR ou MS), obteve-se melhor resultado quando se empregou a suspensão de eritrócitos humanos ou de cobaia a 2,5% em PBS, pH 7,2, com D-manose a 3%. A pesquisa de hemaglutininas X apresentou resultados inconsistentes empregando-se a técnica de aglutinação com suspensão de eritrócitos humanos p defectivos. Na pesquisa de hemglutinação MR se obteve os mesmos resultados empregando-se eritrócitos humanos tipo O, Rh positivo, antígeno P₁ positivo ou eritrócitos grupo A, Rh positivo, antígeno P₁ positivo. As cepas bacterianas manose-resistentes apresentaram o mesmo padrão de aglutinação independente do fato de terem sido cultivadas somente em ágar BHI, ou segundo a técnica descrita por ABALIA et al. (1997), na qual as cepas são inicialmente cultivadas por cinco dias em caldo MH e posteriormente repicadas para ágar CFA. A técnica direta para pesquisa de hemaglutinação citada por DUGUID, CLEGG e WILSON (1979), que preconiza a raspagem do crescimento bacteriano da superfície do ágar e subsequente emulsão direta em suspensão de eritrócitos, apresentou resultados idênticos à técnica tradicional

na qual se reagem volumes iguais de suspensão bacteriana em PBS, pH 7,2, e suspensão de eritrócitos em PBS, pH 7,2. No gráfico 1, p. 63, observa-se a distribuição das diferentes hemaglutininas pesquisadas nas 30 cepas bacterianas em estudo.

A figura 1, p.65, ilustra o aspecto microscópico do fenômeno de hemaglutinação demonstrando uma cepa bacteriana hemaglutinante. A coloração de Giemsa torna evidente a avidéz com que as células bacterianas possuidoras de hemglutininas MR ligam-se à superfície de eritrócitos humanos.

TABELA 3 – EXPRESSÃO FENOTÍPICA *IN VITRO* DE HEMAGLUTININAS MANOSE-RESISTENTES E MANOSE-SENSÍVEIS EM CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *E. coli*

EXPRESSÃO DE HEMAGLUTININAS	ERITRÓCITOS				<i>S. cerevisiae</i>	
	Humanos		Cobaias			
	M-	M+	M-	M+	M-	M+
Nº de Cepas (%)						
Cepas hemaglutinantes: 25 (83,3)						
Cepas MRMS: 9 (30)	+	+	+	—	+	—
Cepas MR: 4 (13,3)	+	+	—	NT	—	NT
Cepas MS: 12 (40)	—	NT	+	—	+	—
Não hemaglutinantes: 5 (16,6)	—	NT	—	NT	—	NT

NOTAS: MR: Manose-resistente, MS: Manose-sensível.

M+: com manose, M-: sem manose.

+ Aglutinação, — Ausência de aglutinação.

NT: Não testado.

A figura 2, p.66, mostra a reação positiva de aglutinação de células de *S. cerevisiae* com cepas de *E. coli*. As figuras 3, p.67, e a figura 4, p.68, permitem observar a interação entre cepas de *E. coli* aglutinantes e não aglutinantes, respectivamente. As células leveduriformes coram-se pelo corante de Gram apresentando-se roxas, enquanto que as células bacterianas Gram-negativas não retêm

o corante e coram-se em vermelho pela fucsina.

5.2 PESQUISA DE HEMOLISINAS

Das 30 cepas de *E. coli* testadas, oito (26,6%) apresentaram-se hemolíticas quando semeadas em ágar-sangue de carneiro a 5%. Na figura 5, p.69, observa-se o halo claro formado em torno de colônias de cepas hemolíticas de *E. coli*, após desenvolvimento em ágar – sangue por 16 a 18 horas a 37° C, em contraste com cepas não hemolíticas. A zona clara é decorrente da lise dos eritrócitos que suplementam o meio de cultivo bacteriano. A tabela 4, p.58, permite identificar nas cepas bacterianas a expressão simultânea de hemolisinas e hemaglutininas. Todas as cepas hemolíticas também expressaram hemaglutininas MS. O gráfico 2, p.64, ilustra a associação encontrada entre MSHA e hemólise.

TABELA 4 – FATORES DE VIRULÊNCIA (HEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-RESISTENTE, HEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-SENSÍVEL E HEMÓLISE) EM 30 CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *E. coli*

EXPRESSÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA	N.º DE CEPAS (%)
Hemaglutinação	25 (83,3)
Cepas expressando hemaglutininas MR	13 (43,3)
Cepas expressando hemaglutininas MS	21 (70)
Hemólise e Hemaglutinação	8 (26,6)
Cepas exclusivamente hemolíticas	0
Cepas MRMS e hemolíticas	4 (13,3)
Cepas MR e hemolíticas	0
Cepas MS e hemolíticas	4 (13,3)
Ausência de aglutinação e de hemólise	5 (16,6)

NOTA: MR: Manose-resistente, MS: Manose-sensível.

5.3 TESTE DE ADESÃO BACTERIANA A CÉLULAS HEP-2

Entre os diferentes tempos de infecção e diferentes concentrações bacterianas testadas para se determinar a capacidade adesiva das cepas bacterianas, adotou-se como procedimento padrão o emprego do inóculo bacteriano de aproximadamente 3×10^7 UFC/mL e do tempo de infecção de 3 horas. Esse foi o inóculo bacteriano máximo permitido para o teste de aderência, uma vez que cepas hemolíticas em concentrações superiores a essa se apresentaram citotóxicas para a monocamada de cultivo celular (figura 12, p.76). Na tabela 5, p.60, observa-se que o número de células bacterianas aderidas a células eucarióticas teve relação direta com a concentração do inóculo bacteriano e com o tempo de infecção. De modo geral, cepas MRMS apresentaram taxas mais elevadas de aderência celular (aproximadamente 6,3 bactérias/célula HEp-2). Cepas MRHA apresentaram taxas discretas de adesão (aproximadamente 3,8 bactérias/célula HEp-2), enquanto que as MSHA apresentaram baixo poder de aderência celular (aproximadamente 1,3 bactérias/célula HEp-2). As cepas de *E. coli* que não expressaram hemaglutininas, praticamente, não aderiram à monocamada celular.

Foram observadas três maneiras distintas de aderência celular: 1 – difusa, caracterizada pela distribuição das bactérias por toda a superfície da célula (figura 6, p.70); 2 - em agrupamentos semelhantes àqueles encontrados na aderência localizada típica de *E. coli* enteropatogênica (figura 7, p.71). A técnica descrita por SCALETSKY, SILVA e TRABULSI (1984) possibilitou observar com mais nitidez a formação dos agrupamentos bacterianos (figura 11, p.75). De modo geral, cada célula HEp-2 apresentou um agrupamento bacteriano, porém, cepas muito aderentes, como foi o caso da cepa n.º 30, formaram de dois a três agrupamentos por célula (figura 9, p.73); 3 - em agregados semelhantes a “pilhas de tijolos” (figura 10, p.74). Os três tipos de aderência não foram constantemente expressos por uma mesma cepa bacteriana. Nos ensaios de aderência, em alguns casos, houve a formação de vacúolos citoplasmáticos, porém, como o fenômeno não se apresentou de forma reprodutível, não foi possível relacioná-lo a uma determinada cepa ou a um artifício técnico (figura

11, p.75). O emprego de inóculo de células HEp-2 de aproximadamente $1,2 \times 10^5$ células/mL e período de incubação de 48 horas garantiu o crescimento semiconfluentes das camadas celulares (figura 13, p.77). Observou-se que a D-manose a 1% provocou aumento na capacidade adesiva das cepas de *E. coli* que expressaram adesinas manose-resistentes (figura 14, p.78 e figura 15, p.79).

TABELA 5 - EFEITO DA DENSIDADE DO INÓCULO BACTERIANO E DO TEMPO DE INFECÇÃO SOBRE A CAPACIDADE ADESIVA DE CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *E. coli*

CEPAS (Fenótipo Hemaglutinante) n.º e tipo	INÓCULO (UFC/mL)			TEMPO (HORAS)		
	Tempo Fixo (3 horas)			Concentração Fixa (3×10^7 UFC/mL)		
	7×10^6	3×10^7	6×10^8	2:00	2:30	3:00
2 (MRMS)	⁽¹⁾ 3,4	7,7	25,0	3,6	4,8	7,7
4 (MRMS)	6,0	10,4	NT	6,4	10,2	10,4
8 (MRMS)	3,0	3,8	13,5	2,3	3,3	3,8
11 (MRMS)	4,6	6,8	27,0	4,9	5,6	6,8
14 (MR)	4,0	4,3	11,0	2,3	4,0	4,3
15 (MR)	2,0	2,2	11,0	1,6	2,0	2,2
19 (MR)	1,6	2,0	6,0	1,6	1,5	2,0
21 (MR)	4,2	7,0	13,0	3,6	4,0	7,0
22 (MRMS)	11,0	9,6	⁽²⁾ ...	6,8	9,0	9,6
23 (MRMS)	6,0	6,3	...	2,0	4,6	6,3
27 (MRMS)	6,0	7,0	...	4,0	4,0	7,0
29 (MRMS)	4,7	5,0	...	3,4	4,0	5,0
30 (MRMS)	13,0	20,3	56,0	10,4	12,8	20,3

NOTAS: MR: Manose-resistente, MS: Manose-sensível.

UFC: Unidades formadoras de colônia.

NT: Não testado.

(1) Número médio de bactérias aderidas a células HEp-2.

(2) Cepas hemolíticas causando descolamento da monocamada celular.

5.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CEPAS BACTERIANAS

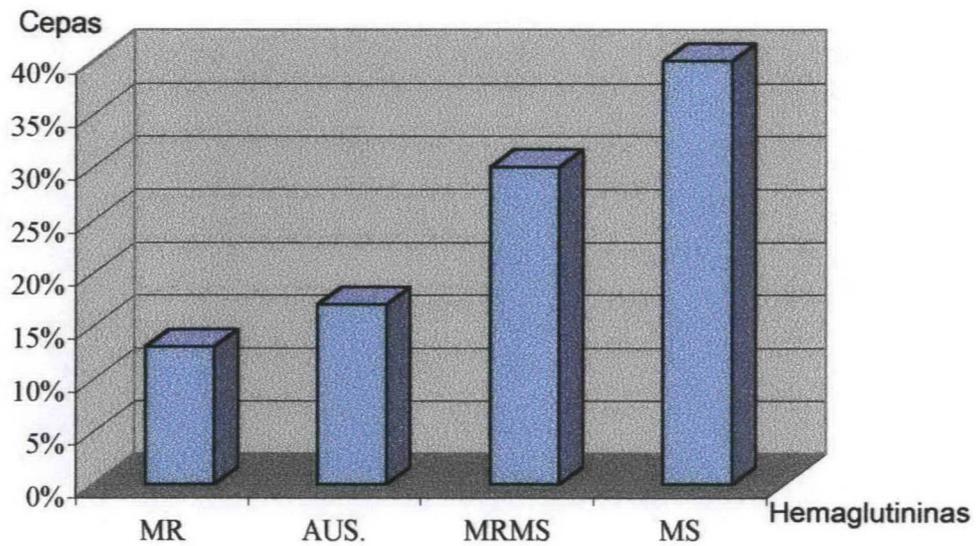
A tabela 6, p.62, mostra a expressão fenotípica *in vitro* de hemaglutininas, adesinas e hemolisinas nas 30 cepas de *E. coli* selecionadas para esta pesquisa e as características dos pacientes quanto ao sexo, idade e indicação clínica.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE 30 CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *E. coli* QUANTO À EXPRESSÃO DE HEMAGLUTININAS, ADESINAS E HEMOLISINAS E PERFIL DOS PACIENTES EM RELAÇÃO A SEXO, IDADE E INDICAÇÃO CLÍNICA

CEPAS n°	DADOS DOS PACIENTES			FENÓTIPO	ADESÃO CELULAR (Bactéria/célula HEp-2)	HEMÓLISE
	Sexo	Idade	Indicação clínica			
01	F	53	Rotina	— —	—	—
02	F	51	Infecção urinária	MRMS	7,7	—
03	M	73	Controle	MS	1,0	—
04	F	28	Rotina	MRMS	10,4	—
05	F	35	Pré-operatório	MS	0,6	—
06	F	51	Rotina	MS	0,7	—
07	F	98	Infecção urinária	— —	0,3	—
08	F	39	Dor lombar	MRMS	3,8	—
09	M	70	Orquite	— —	—	—
10	F	65	Investigação	MS	0,4	+
11	F	35	Pré-operatório	MRMS	6,8	—
12	F	22	Pré-natal	MS	2,4	—
13	F	42	Infecção urinária	MS	3,5	—
14	F	37	Rotina	MR	4,3	—
15	F	23	Disúria	MR	2,2	—
16	F	36	Infecção urinária	MS	1,7	—
17	F	23	Pielonefrite	MS	1,8	+
18	F	24	Pielonefrite	— —	—	—
19	F	26	Pielonefrite	MR	2,0	—
20	F	42	Investigação	— —	0,4	—
21	F	29	Rotina	MR	7,0	—
22	F	43	Rotina	MRMS	9,6	+
23	F	57	Investigação	MRMS	6,3	+
24	F	44	Investigação	MS	0,7	—
25	M	56	Rotina	MS	0,3	+
26	F	35	Pré-operatório	MS	0,8	—
27	F	51	Investigação	MRMS	7,0	+
28	F	49	Transplante hepático	MS	2,0	+
29	F	28	Pielonefrite	MRMS	5,0	+
30	F	24	Infecção urinária	MRMS	20,3	—

NOTA: MR: Manose-resistente, MS: Manose-sensível, —: negativo, +: positivo.

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DE HEMAGLUTININAS MR E MS EM 30 CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *Escherichia coli*



NOTAS: MR: Manose -resistente.

AUS.: Ausência de hemaglutininas.

MRMS: Manose -resistente e Manose -sensível.

MS: Manose -sensível.

GRÁFICO 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE HEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-SENSÍVEL (MS) E PRODUÇÃO DE HEMOLISINA (Hly) EM 21 CEPAS UROPATOGÊNICAS DE *Escherichia coli*

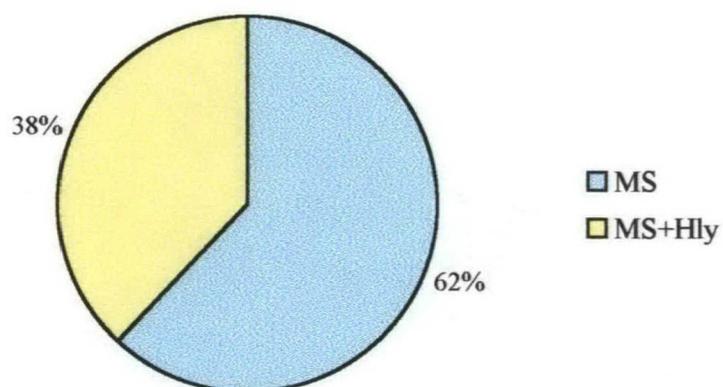
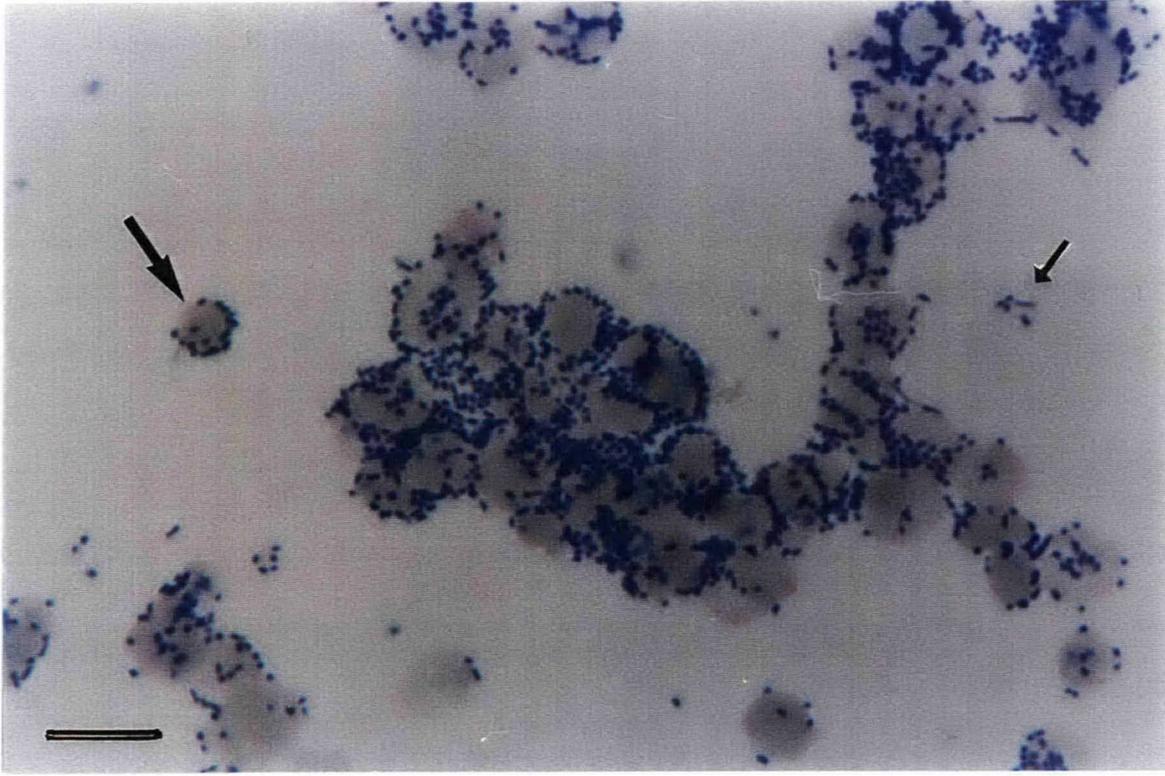
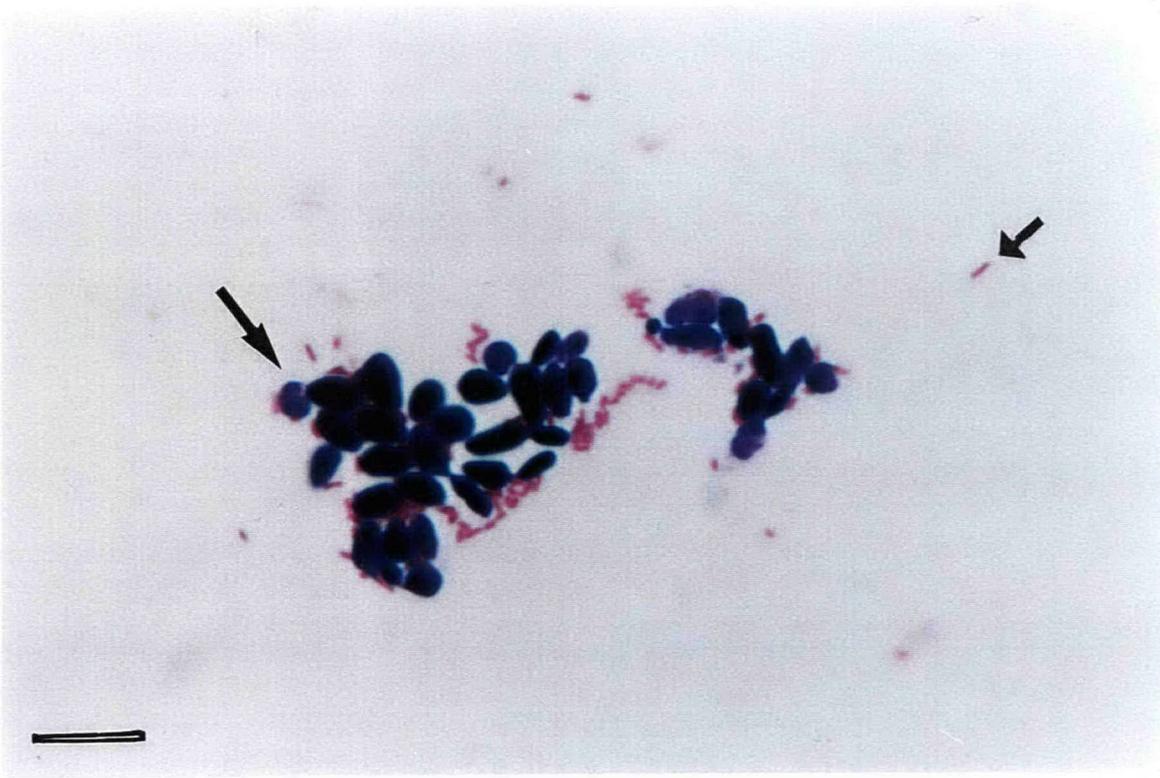


FIGURA 1 - AGLUTINAÇÃO DE CEPA DE *E. coli* COM ERITRÓCITOS HUMANOS

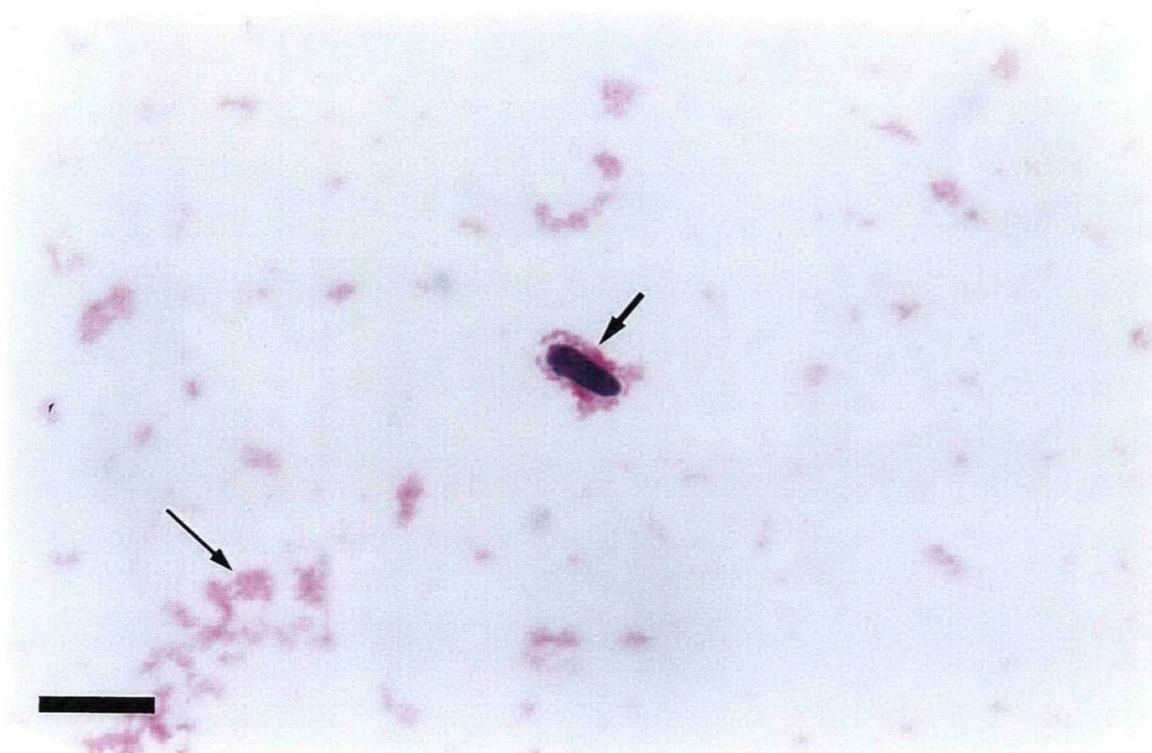
NOTA: → bactérias; → eritrócitos; barra: 10 μm (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 2 - AGLUTINAÇÃO DE CEPA DE *E. coli* COM *S. cerevisiae*



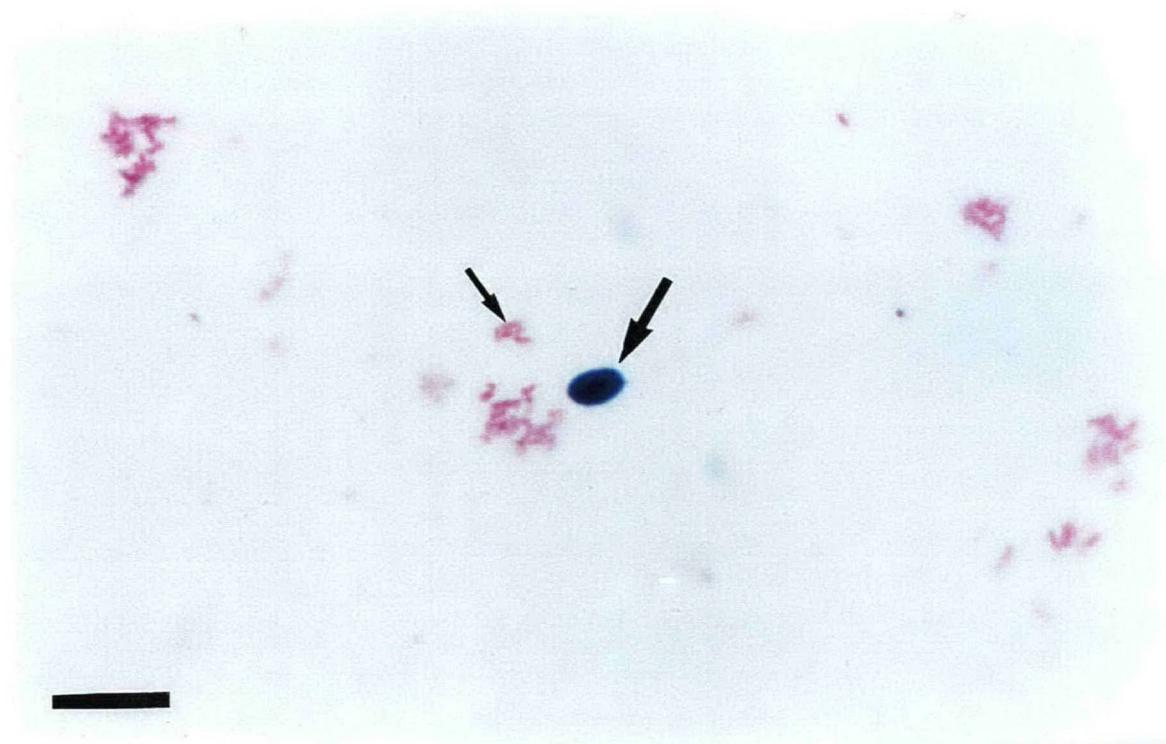
NOTA: → bactérias; → leveduras; barra: 10 μm (Gram, x 1379,40).

FIGURA 3 – DETALHE DA INTERAÇÃO ENTRE CEPA DE *E. coli* E *S. cerevisiae*



NOTA: → bactérias; ➔ leveduras; barra: 10 μm (Gram, x 1379,40).

FIGURA 4 – REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO NEGATIVA ENTRE CEPA DE *E. coli* E *S. cerevisiae*

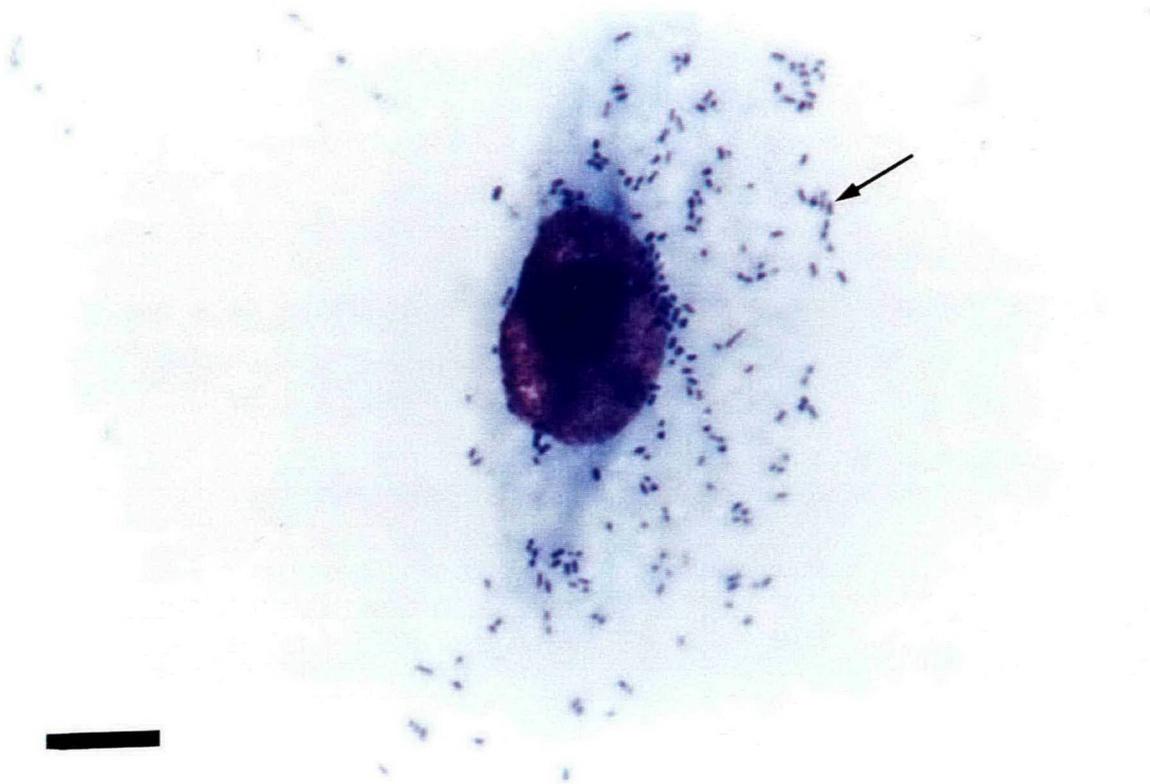


NOTA : → bactérias; ➔ leveduras; barra: 10 μm (Gram, x 1379,40).

FIGURA 5 - *E. coli* CULTIVADA EM ÁGAR-SANGUE APRESENTANDO REAÇÃO NÃO HEMOLÍTICA (ESQUERDA) E HEMOLÍTICA (DIREITA)

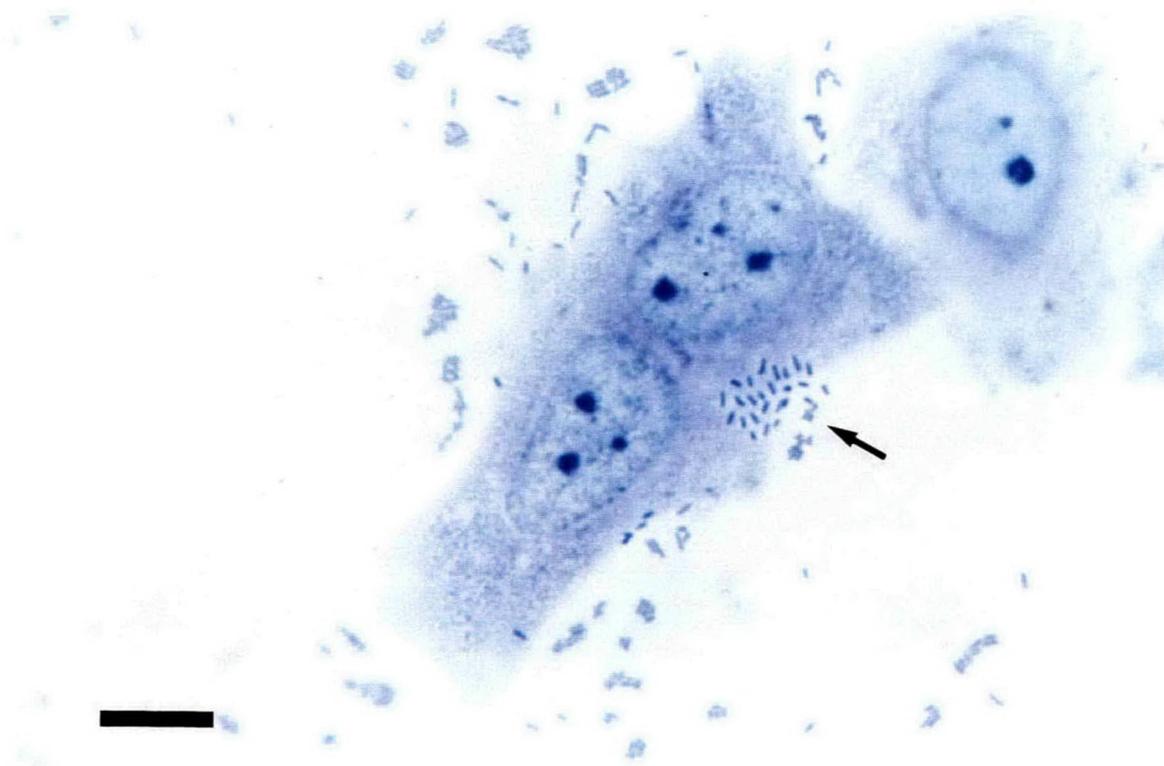


FIGURA 6 – ADERÊNCIA DIFUSA DE *E. coli* UROPATOGÊNICA EM CÉLULAS HEp-2



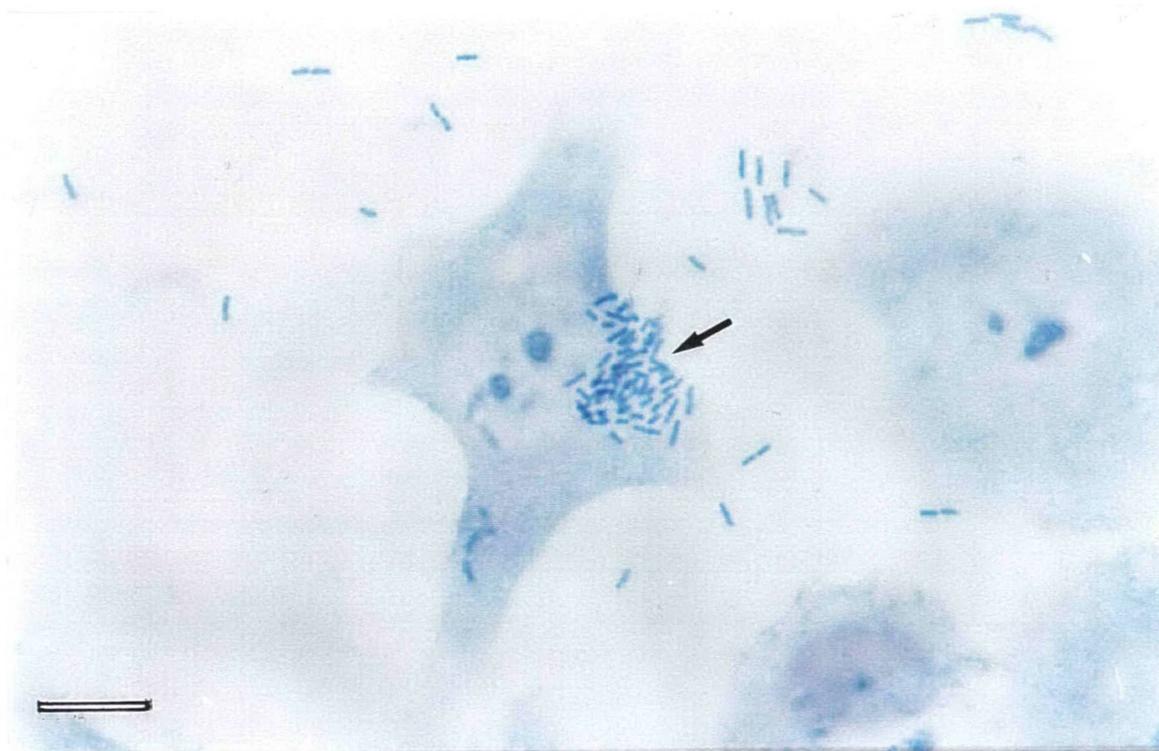
NOTA: → bactérias; barra: 10 μm (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 7 – ADERÊNCIA EM AGRUPAMENTOS LOCALIZADOS DE *E. coli* UROPATOGÊNICA EM CÉLULAS HEp-2



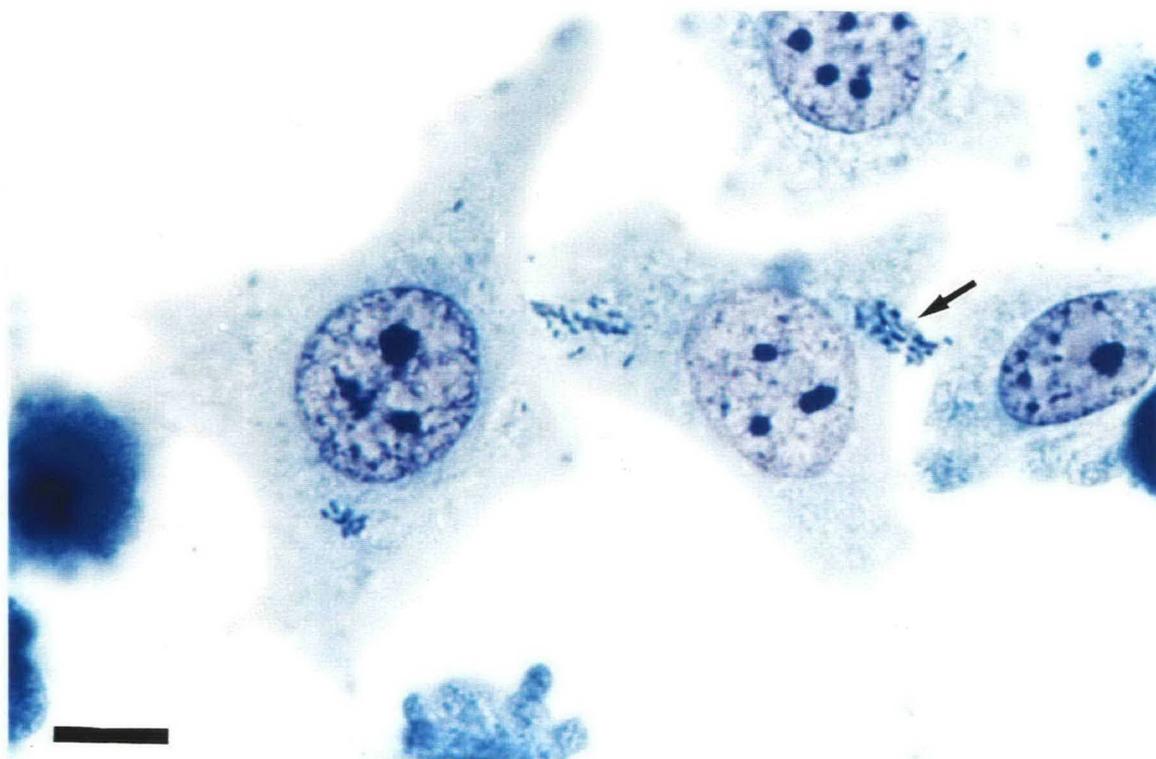
NOTA: → bactérias; barra: 10 μm (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 8 - *E. coli* UROPATOGÊNICA FORMANDO UM AGRUPAMENTO LOCALIZADO EM CÉLULA HEp-2



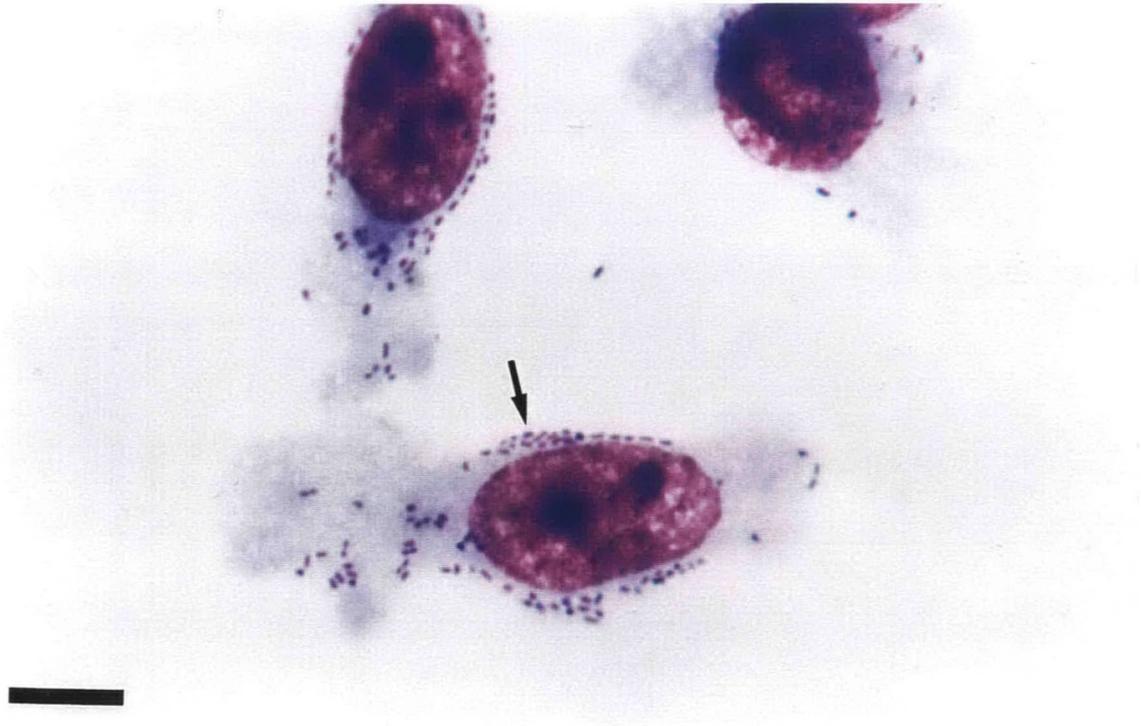
NOTA: → bactérias; barra: 10 μm (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 9 - *E. coli* UROPATOGÊNICA FORMANDO DOIS AGRUPAMENTOS LOCALIZADOS EM CÉLULA HEp-2



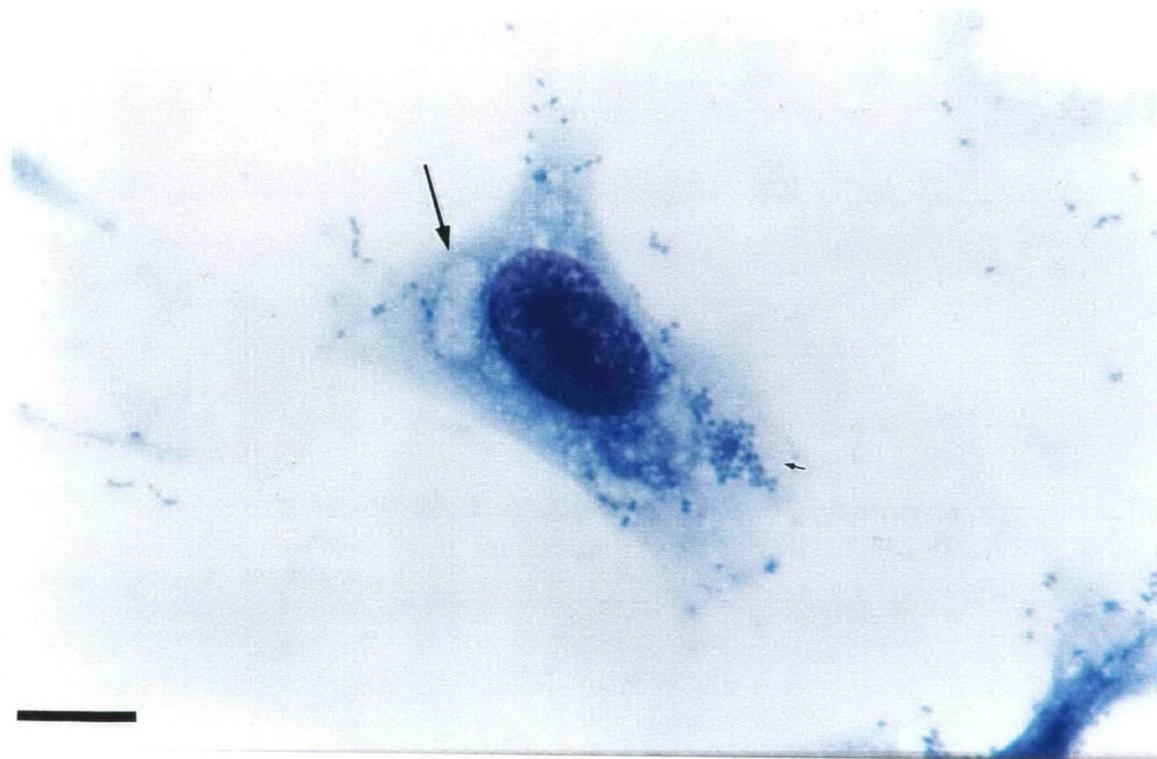
NOTA: → bactérias; barra: 10 μm (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 10 - *E. coli* UROPATOGÊNICA ADERINDO EM FORMA DE AGREGADOS A CÉLULAS HEp-2

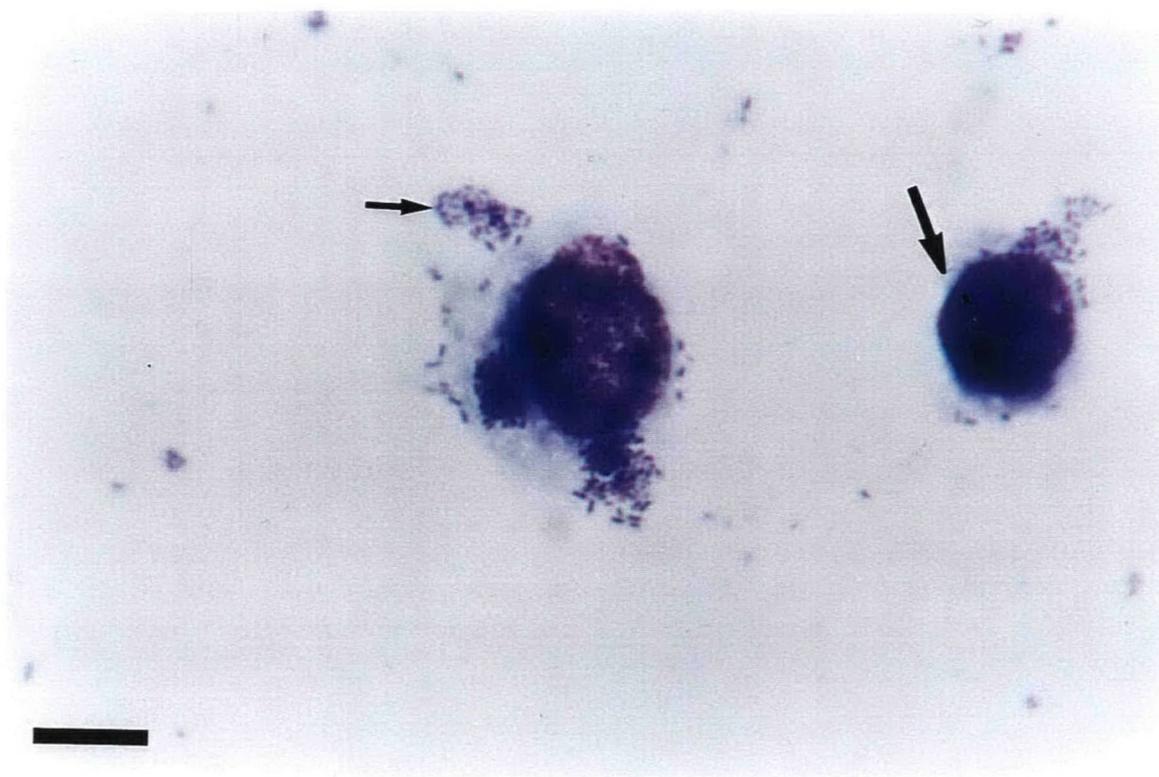


NOTA: → bactérias; barra: 10 μm (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 11 – CÉLULA DA LINHAGEM HEp-2 INFECTADA COM *E. coli* UROPATOGÊNICA E APRESENTANDO VACÚOLOS CITOPLASMÁTICOS

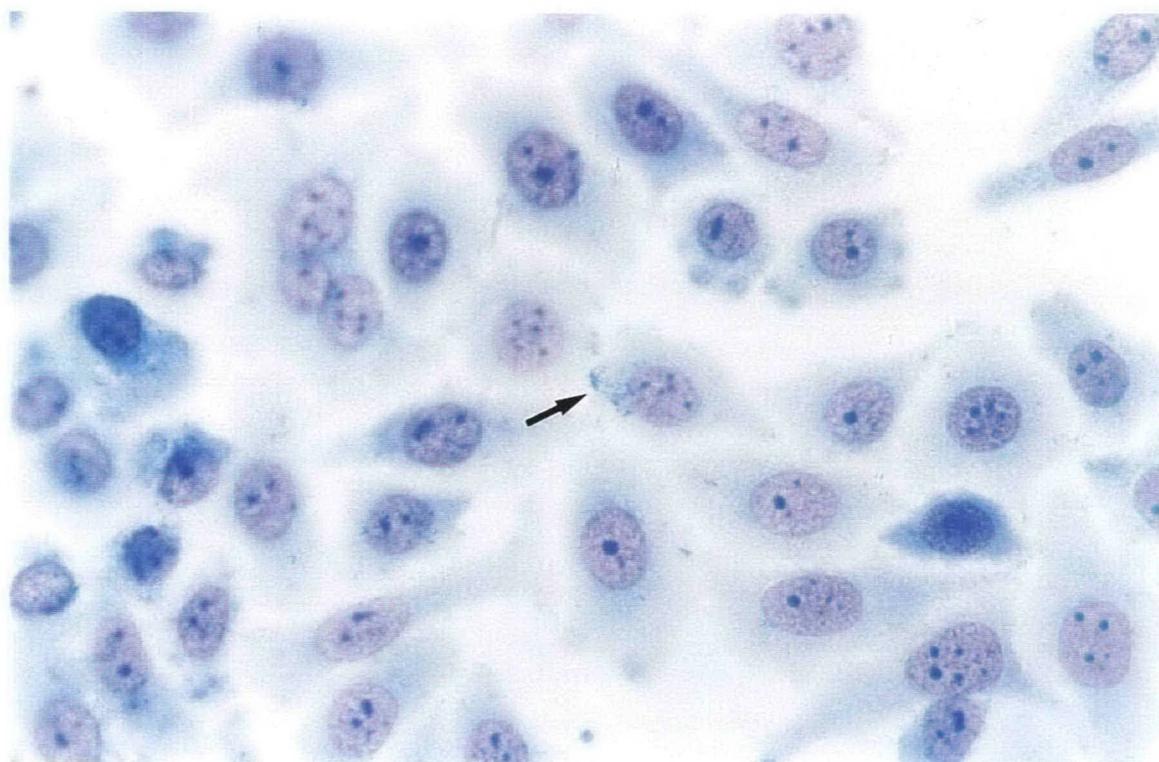


NOTA: → bactérias; ➤ vacúolos; barra: 10 μm (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 12 – EFEITO CITOTÓXICO DE CEPA DE *E. coli* HEMOLÍTICA EM CÉLULAS HEp-2

NOTA: → bactérias; ➔ rompimento da membrana citoplasmática; barra: 10 μ m (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 13 – MONOCAMADA SEMICONFLUENTE DE CÉLULAS HEp-2



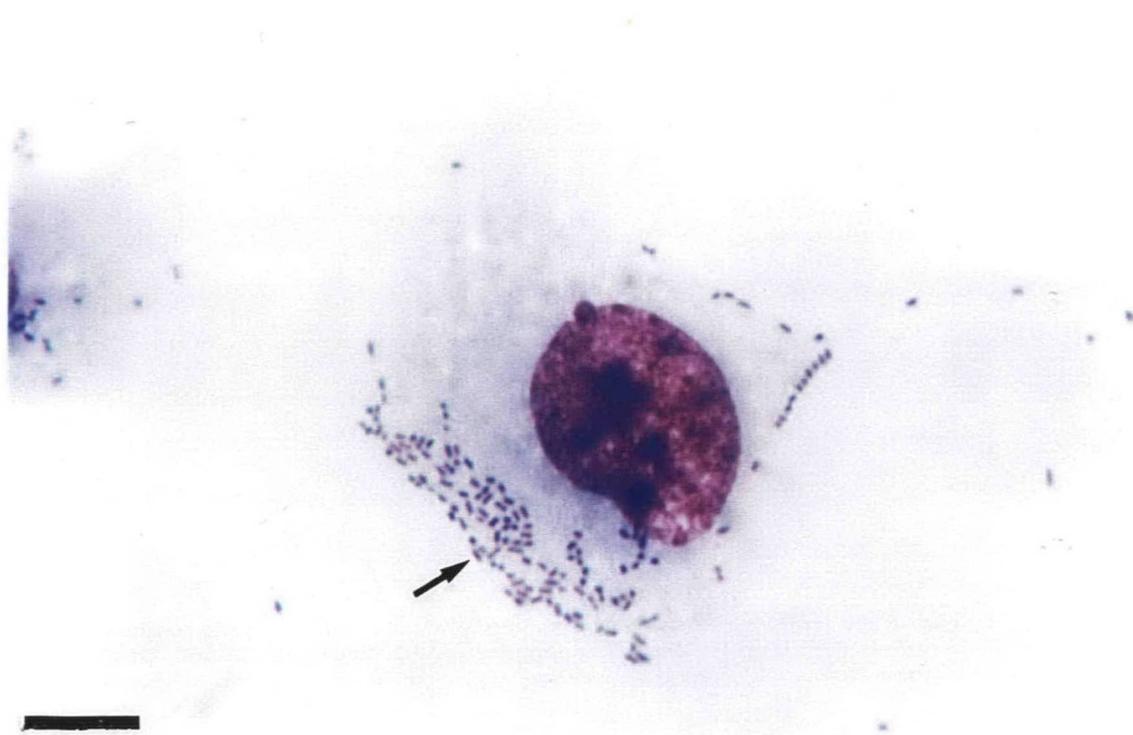
NOTA: → bactérias (Giemsa, x 965,58).

FIGURA 14 – ADESÃO DE CEPA DE *E. coli* A CÉLULAS HEp-2 NA PRESENÇA DE D-MANOSE



NOTA: → bactérias; barra: 10 μm (Giemsa, x 1379,40).

FIGURA 15 – ADESÃO EM AGREGADOS DE CEPA DE *E. coli* A CÉLULAS HEp-2, NA PRESENÇA DE D-MANOSE



NOTA: → bactérias (Giemsa, x 1379,40).

6 DISCUSSÃO

6.1 QUANTO À HEMAGLUTINAÇÃO

O desempenho do teste de aglutinação das cepas de *E. coli* expressando hemaglutininas manose-sensíveis com a suspensão de leveduras foi concernente com os relatos de vários pesquisadores, que utilizaram suspensões leveduriformes de *Candida albicans* ou de *S. cerevisiae* (EISENSTEIN; OFEK; BEACHEY, 1979; HAGBERG et al., 1981; OFEK; MOSEK; SHARON, 1981). Conforme a tabela 3, p.57, as cepas de *E. coli* expressando MSHA ligaram-se tanto a células leveduriformes quanto a eritrócitos de cobaia na ausência de D-manose. Em contraste, as cepas possuidoras apenas de hemaglutininas manose-resistentes não aglutinaram as células leveduriformes. A pesquisa de hemaglutininas MS mostrou resultados constantes tanto com eritrócitos de cobaia quanto com leveduras. As bactérias que não apresentaram hemaglutininas MS nas concentrações empregadas no teste (10^9 UFC/mL), mesmo quando suspendidas em concentrações de até 10^{11} UFC/ mL, não aglutinaram eritrócitos de cobaia e células leveduriformes. Porém, a pesquisa de hemaglutininas MR mostrou certo grau de indefinição de acordo com variações na concentração do inóculo. Aumentando-se a concentração bacteriana de 10^9 UFC/mL para 10^{11} UFC/ mL, cepas que a princípio foram negativas para hemaglutinação MR, apresentaram uma discreta aglutinação. Essas cepas foram classificadas com manose-resistentes. Segundo CHICK et al. (1981), a cepa bacteriana com esse tipo de comportamento pode estar apresentando um número reduzido de células expressando hemaglutininas MR. Esses dados revelam que a pesquisa de hemaglutininas MR, com as técnicas presuntivas descritas na literatura, apresenta limitações técnicas que requerem cautela na interpretação dos resultados.

As cepas MSHA mantiveram o mesmo padrão de hemaglutinação, independente do período de estocagem ou do número de passagens em meios de

cultivo. A maioria das cepas MRHA também manteve constante o título de hemaglutinação, porém, as cepas n. ° 6 e 19, quando retestadas após períodos de estocagem prolongados (dois a seis meses) ou após vários repiques em ágar, perderam parte de sua capacidade hemaglutinante. DUGUID, CLEGG e WILSON (1978) descreveram fenômeno semelhante ao trabalharem com cepas uropatogênicas de *E. coli* MRHA. O contrário aconteceu com a cepa 4 que inicialmente não expressou hemaglutininas e após vários repiques em ágar apresentou o fenótipo MRMS. A cepa 22, a princípio, foi classificada como MSHA e após várias passagens em ágar apresentou-se como MRMS. Há que se considerar a possibilidade de ter ocorrido a transmissão plasmidial desses fatores de virulência entre as cepas de *E. coli* em estudo. Esses resultados reforçam as considerações de KISIELIUS et al. (1989), que, ao estudarem a expressão de adesinas em *E. coli*, constataram que não havia concordância absoluta entre os títulos de hemaglutinação e o estado de piliação bacteriana. Os autores encontraram cepas que reagiram positivamente com sondas de fímbria P e nem sempre expressaram hemaglutinação manose-resistente. Concluíram que condições ambientais *in vitro* podem interferir na expressão das adesinas.

Sob as condições empregadas no presente trabalho não foi possível diferenciar as cepas MRHA com fímbria P daquelas com adesinas X. Segundo a classificação de EDÉN (1986), as cepas de *E. coli* que expressam apenas as adesinas genericamente denominadas de X são manose-resistentes, mas não são específicas para receptores de eritrócitos humanos grupo P₁, reagindo também com eritrócitos humanos p defectivos. As cepas de *E. coli*, que expressam simultaneamente fímbria P e adesinas X, também aglutinam os dois tipos sangüíneos, enquanto que as cepas unicamente P-fimbriadas só aglutinam eritrócitos humanos P₁. A princípio, apenas as cepas 29 e 30 aglutinaram ambos os tipos sangüíneos, porém, em ensaios subseqüentes, outras cepas apresentaram variabilidade na expressão fenotípica de adesinas MR. A falta de reprodutibilidade apresentada pelos testes presuntivos para diferenciação entre adesinas X e adesinas da fímbria P leva a considerar que apenas ensaios em bases moleculares podem distinguir efetivamente esses dois tipos de moléculas adesivas

Embora o número reduzido de cepas testadas não seja suficiente para uma

comparação de dados, observando-se a distribuição de hemaglutininas entre as 30 cepas de *E. coli* testadas (tabela 3, p. 57 e gráfico 1, p.63), percebe-se concordância parcial com resultados obtidos por outros pesquisadores. No presente trabalho encontrou-se em 70% dos isolados (21 cepas) a expressão de hemaglutininas MS, 40% (12 cepas) expressando somente hemaglutinina MS e 30% (nove cepas) expressando hemaglutininas MS juntamente com MR (tabela 4, p.58). Esses achados corroboram os dados da literatura que apontam a expressão de hemaglutininas MS como um importante fator de virulência em cepas de *E. coli* uropatogênicas. HAGBERG et al. (1981), ao pesquisarem fatores de virulência em cepas uropatogênicas de *E. coli*, também encontraram aproximadamente 70% delas expressando hemaglutininas MS. Por sua vez, PARRY et al. (1983) detectaram hemaglutinação MS em 56,6% das cepas de *E. coli* isoladas de pacientes hospitalares e com bacteriúria significativa. Esses resultados também demonstram a distribuição ubíqua das hemaglutininas manose-sensíveis entre as enterobactérias, fato que as torna alvo de controvérsias entre os pesquisadores quanto à sua efetiva contribuição para o potencial de virulência do patógeno. Porém, elevadas taxas de expressão de hemaglutininas MS em bactérias causadoras de cistite têm direcionado esforços no sentido de elucidar o seu verdadeiro papel na patogênese das infecções do trato urinário. É conhecido que as duas propriedades conferidas a bactérias que expressam hemaglutininas MS (ligação à glicoproteína de TAMM-HORSFALL do muco urinário e a polimorfonucleares) contribuem para sua remoção do organismo do hospedeiro (EDÉN, 1986). A expressão de altas taxas de hemaglutininas MS é um fenômeno que pode ser interpretado como uma estratégia bacteriana para sobrepujar essa desvantagem e colonizar o uroepitélio.

As hemaglutininas manose-resistentes foram expressas por um número menor de cepas em relação às hemaglutininas manose-sensíveis. No presente trabalho, 13 cepas (43,3%) apresentaram hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humanos, sendo que nove cepas (30%) exibiram o fenótipo MRMS, ou seja, expressaram os dois tipos de adesinas, e quatro cepas (13,3%) expressaram MRHA isoladamente (tabela 4, p.58, gráfico 1, p.63). Na pesquisa de GREEN e THOMAS

(1981), 56% das cepas uropatogênicas de *E. coli* hemaglutinaram eritrócitos humanos via manose-resistente. O percentual obtido por PARRY et al. (1983) foi de 13,8% de cepas uropatogênicas de *E. coli* apresentando isoladamente hemaglutininas MR. Estudos epidemiológicos documentam a relação direta que há entre cepas de *E. coli* portadoras de hemaglutininas MR e severidade das infecções urinárias. A hemaglutinação MR torna-se um indicador do potencial adesivo bacteriano e sua capacidade de colonizar superfícies epiteliais.

Conforme a tabela 3, p.57, obteve-se uma quantidade de 30% de bactérias expressando o fenótipo MRMS, enquanto que PARRY et al. (1983) relatam o isolamento de 26,6% de cepas uropatogênicas de *E. coli* expressando simultaneamente hemaglutininas MS e MR. Acredita-se que a informação genética para ambas as adesinas, MS e MR, capacita a bactéria a exercer seu poder de invasão, permitindo a expressão simultânea ou alternada das adesinas conforme as condições ambientais, através de um mecanismo de cooperativismo e seleção. As cepas classificadas como MRMS, ou seja, que apresentaram simultaneamente os dois tipos de adesinas, revelam a capacidade bacteriana de expressar fatores de virulência adequados às condições do meio ambiente.

Bactérias que não expressaram nenhum tipo de hemaglutinina detectável através das técnicas empregadas corresponderam a 16,6% dos casos (cinco cepas). Porém, deve-se considerar as limitações desses testes presuntivos e a possibilidade de ocorrência de outros tipos de hemaglutininas, não incluídas nesta pesquisa, entre os isolados clínicos. Outra hipótese, baseada nos trabalhos de KISIELIUS et al. (1989), aventa a possibilidade de que condições ambientais de cultivo, armazenagem e as várias passagens bacterianas para meios de conservação podem atuar sobre a expressão de fatores de virulência obscurecendo-os.

6.2 QUANTO À HEMÓLISE

Sob as condições empregadas nesta pesquisa 26,6% das cepas de *E. coli* (8 cepas) apresentaram-se hemolíticas e simultaneamente expressaram adesinas, sendo

que quatro cepas expressaram somente hemaglutininas MS, enquanto que quatro cepas apresentaram o fenótipo MRMS (tabela 4, p.58). Dessa forma, todas as cepas que expressaram hemolisinas também expressaram hemaglutininas MS. Embora a expressão desses dois fatores de virulência constitua fenômeno que pode ocorrer isoladamente, o gráfico 2, p.64, ilustra a associação que houve entre cepas MSHA e produção de hemólise. Pesquisas têm indicado a possibilidade de que hemaglutinação e hemólise, além de outros fatores de virulência, sejam fenômenos codificados por blocos de genes inseridos em ilhas associadas à patogenicidade situadas no ADN bacteriano em regiões circunvizinhas aos genes que codificam para o RNA transportador, ou mesmo dentro dessa região. Ainda não está claro se o fato dessas seqüências gênicas estarem localizadas em regiões próximas acarreta a expressão simultânea de seus produtos (MOBLEY, 2000).

GREEN e THOMAS (1981) encontraram hemólise em 67% das cepas de *E. coli* isoladas de urina de pacientes com infecção do trato urinário. IKÄHEIMO et al. (1993), ao estudarem as características de cepas de *E. coli* uropatogênicas relacionadas à cistite, encontraram 22,5% dos isolados apresentando propriedade hemolítica. Posteriormente IKÄHEIMO et al. (1994) acharam 35% de cepas de *E. coli* pielonefritogênicas expressando hemolisinas. ANDREU et al. (1997) relatam atividade hemolítica em 57% de cepas de *E. coli* pielonefritogênicas e em 55% de cepas causadoras de cistite. Os autores presumem que a hemolisina contribui para injúria tecidual através de efeitos citolíticos e, dessa forma, propicia a invasão bacteriana e a persistência do microrganismo no trato urinário do hospedeiro. Outro efeito seria a ação hemolítica que forneceria ao microrganismo uma fonte de ferro ou, ainda, a lise de células fagocitárias e, conseqüentemente, proteção contra a fagocitose.

A associação entre a produção de hemolisinas e expressão de hemaglutininas MS em cepas de *E. coli* uropatogênicas, constatada no presente trabalho, leva a considerar que esse fato possa se constituir em mais uma estratégia bacteriana para se livrar do mecanismo de fagocitose. Como as hemaglutininas MS possuem receptores em células fagocitárias, a produção simultânea de hemolisina teria a finalidade de lisar essas células e, desse modo, garantir a persistência da bactéria no trato urinário.

6.3 QUANTO À ADESÃO BACTERIANA A CÉLULAS EPITELIAIS

Confirmando os dados da literatura constatou-se, neste estudo, significativa capacidade adesiva nos isolados uropatogênicos. Todas as cepas bacterianas que expressaram hemaglutininas aderiram à linhagem celular HEp-2, sendo que aquelas com fenótipo MRMS apresentaram capacidade adesiva mais pronunciada (aproximadamente 6,3 bactérias/célula HEp-2). As cepas que expressaram somente hemaglutininas MR apresentaram discreta capacidade adesiva (aproximadamente 3,8 bactérias/célula HEp-2), enquanto que as cepas apenas com hemaglutininas MS, em geral, apresentaram baixa capacidade adesiva (aproximadamente 1,3 bactérias/célula HEp-2). Estudos têm relatado que a maioria das cepas MS liga-se muito pouco a células epiteliais, sendo excepcional o relato desse tipo de cepa com alta capacidade adesiva (EDÉN, 1986). Entretanto, conforme a tabela 6, p.62, observa-se que algumas cepas expressando exclusivamente hemaglutininas MS aderiram de forma mais eficiente que cepas unicamente com hemaglutininas MR e sabidamente pielonefritogênicas. CHICK et al. (1981) também relatam discrepâncias entre a hemaglutinação e a adesão celular. Portanto, há que se considerar a interferência de uma grande variedade de antígenos bacterianos capazes de produzir hemaglutinação, além das adesinas. As cepas não hemaglutinantes praticamente não aderiram a células HEp-2. Embora seja difícil a caracterização experimental do ambiente no qual ocorre a interação “parasita-hospedeiro”, os resultados obtidos com o emprego de linhagens epiteliais *in vitro*, permitiu verificar que a expressão de hemaglutininas foi um fator preditivo da capacidade adesiva bacteriana.

A concentração do inóculo bacteriano foi determinante para o aumento da capacidade adesiva, principalmente em concentrações acima de 10^7 UFC/mL. O prolongamento do tempo de infecção apresentou efeito mais discreto sobre a capacidade adesiva bacteriana. Resultados semelhantes a esses foram encontrados por GOLUSZKO et al. (1997) em relação ao aumento na capacidade adesiva bacteriana conforme se aumenta a concentração bacteriana e o tempo de exposição. O período máximo de tempo testado, 3 horas, não permitiu que a bactéria atingisse a fase

logarítmica de crescimento.

Segundo TOBE e SASAKAWA (2001), a expressão de adesinas em cepas de *E. coli* diarreio gênicas ocorre com mais intensidade na fase logarítmica. No presente estudo adotou-se o tempo de contato de 3 horas em função das cepas hemolíticas, que em períodos mais prolongados poderiam afetar as monocamadas celulares.

As cepas de *E. coli* uropatogênicas apresentaram padrões de aderência parecidos aos encontrados nas cepas de *E. coli* diarreio gênicas: aderência difusa (figura 6, p.70); aderência semelhante à localizada (figuras 7, p.71, e figura 8, p.72) e aderência em agregados (figura 10, p.74). Ao contrário das cepas de *E. coli* implicadas em infecções intestinais, em relação a cepas de *E. coli* uropatogênicas ainda não se comprovou uma associação entre diferentes padrões de aderência e potencial patogênico dessas cepas.

Estudos consideram provável a transmissão horizontal, entre diferentes cepas bacterianas, dos elementos gênicos que codificam para os fatores de virulência. O gene que codifica para certas características de cepas de EPEC (“locus of enterocyte effacement” - gene LEE) apresenta algumas seqüências similares às encontradas nas ilhas associadas à patogenicidade (PAI) das cepas de *E. coli* uropatogênicas (DONNENBERG; WELCH, 1996). Portanto, cepas de *E. coli* uropatogênicas e diarreio gênicas podem compartilhar fatores de virulência em comum. Para se confirmar se as cepas uropatogênicas deste estudo estão realmente expressando os mesmos padrões de aderência exibidos pelos isolados diarreio gênicos haveria necessidade de uma pesquisa ao nível molecular.

O objetivo principal do ensaio de aderência, nesta pesquisa, foi relacioná-lo ao fenômeno hemaglutinante. A constatação de diferentes padrões de aderência em cepas de *E. coli* uropatogênicas constituiu um dado adicional. Desde que cepas hemolíticas provocaram descolamento da monocamada celular em concentrações mais elevadas, para se estabelecer a capacidade adesiva de todas as cepas, hemolíticas e não hemolíticas, padronizou-se o inóculo de 3×10^7 UFC/mL. Desse modo, não foi possível estabelecer o tipo exato de aderência para cada cepa. Para tanto, seria

necessário excluir as cepas hemolíticas e, para as demais, empregar inóculos mais densos e tempo de infecção mais prolongado com o propósito de permitir à cepa bacteriana alcançar a fase logarítmica de crescimento.

Pesquisas adicionais serão necessárias para verificar se, como acontece com cepas de *E. coli* diarreio gênicas, as características fenotípicas de aderência celular apresentadas por essas cepas uropatogênicas estão associadas ao papel que desempenham no estabelecimento de processos infecciosos do trato urinário.

Conforme tabela 5, p.60, as cepas com fenótipo MRMS e hemolíticas danificaram a monocamada de cultivo celular descolando-a da lamínula (figura 12, p.76). Cepas diarreio gênicas de *E. coli* que causam descolamento de células das lamínulas (CDEC) durante ensaios de aderência *in vitro* pertencem a um grupo distinto de bactérias enteropatogênicas. O fenômeno de descolamento celular tem sido observado com cepas EaggEC, com cepas DAEC e com algumas cepas de EPEC. MARQUES et al. (1995) correlacionaram o descolamento de monocamadas de células HEp-2 produzido por cepas DAEC à atividade hemolítica. Enquanto que o descolamento de monocamadas de células HeLa, por ação de cepas de EPEC, está relacionado à elevação do Ca^{2+} livre no citoplasma da célula. Os autores identificaram isolados fecais de *E. coli* - em suspensões de aproximadamente 10^8 UFC/mL - que descolaram monocamadas de células HeLa após 3 horas de contato e lisaram eritrócitos no mesmo período de incubação. Através de ensaios de hibridização com sondas de ADN demonstraram que o fenômeno de descolamento celular estava associado à produção de alfa-hemolisina.

GOMES, ABE e MARQUES (1995) encontraram cepas de EAggEC apresentando propriedades hemolíticas e causando descolamento de monocamadas celulares em cultivo.

A maioria das cepas de *E. coli* que causou descolamento celular na pesquisa de FABREGA et al. (2001) apresentou também hemaglutinação manose-resistente, porém, os autores não relataram associação entre descolamento celular e hemólise.

Na presente pesquisa, a cepa pielonefritogênica 29 (tabela 6, p.62) apresentou-

se hemolítica, com fenótipo hemaglutinante MRMS e com aderência celular na forma de agregados em concentração de 3×10^7 UFC/mL (figura 11, p.75). Aumentando-se a concentração para aproximadamente 6×10^8 UFC/mL houve descolamento da monocamada celular. Porém, a interpretação desses dados requer um estudo mais aprofundado, já que ainda não se conhece a importância da aderência agregativa e do descolamento celular em cepas uropatogênicas. Além disso, o padrão de aderência agregativa teria que ser confirmado por métodos moleculares.

As cinco cepas bacterianas que não aderiram às células HEp-2 também não expressaram hemaglutininas, dado que reforça a relação estreita entre hemaglutininas e adesão celular. Outra característica dessas cepas não aderentes e não hemaglutinantes foi a ausência de expressão de hemolisinas.

Bactérias com pouca ou nenhuma capacidade adesiva podem sobreviver no trato urinário causando bacteriúria assintomática, especialmente se há algum fator que predispõe a permanência de urina residual na bexiga como, por exemplo, refluxo vesicoureteral. Porém, conforme EDÉN (1976) essas cepas não podem desencadear uma infecção sintomática a menos que haja um contato estreito entre elas e a célula do hospedeiro. A cepa 18, relacionada à pielonefrite, apresentou-se *in vitro* aparentemente avirulenta. Para explicar o potencial patogênico dessa cepa e das demais não aderentes e não hemolíticas seria necessário investigar outros fatores de virulência, outras moléculas adesivas e também as condições clínicas do paciente.

Devido à reduzida capacidade adesiva das cepas MSHA, não foi possível avaliar o bloqueio do processo quando o ensaio de aderência foi feito na presença de D-manose a 1%. Entretanto, constatou-se incremento nos níveis de adesão celular nas cepas MRMS e MRHA, na presença de D-manose a 1% (figura 14, p.78, e figura 15, p.79). PRADO et al. (1997) demonstraram relação direta entre a densidade de resíduos de manose ligados covalentemente à albumina e as taxas de endocitose da albumina em células hepáticas. Segundo SUGARMAN, EPPS e STENBACK (1982), que relataram aumento na capacidade adesiva bacteriana na presença de zinco, a superfície bacteriana menos negativa após ligação a substâncias com carga positiva facilita a

aderência da bactéria às linhagens celulares.

6.4 QUANTO ÀS CARACTERÍSTICAS DO HOSPEDEIRO

A análise das características dos 30 pacientes, dos quais se obteve as bactérias, permite constatar a alta prevalência de infecções urinárias em pacientes do sexo feminino e em idade reprodutiva. Na tabela 6, p.62, observa-se que os 27 indivíduos do sexo feminino representaram 90% dos pacientes, sendo que 67% das mulheres estavam em idade reprodutiva, dados esses, compatíveis com os descritos pela literatura (KUNIN, 1991; WARREN, 1996). Na presente pesquisa, os dados referentes às condições clínicas do paciente, em particular ao seu estado imunológico, foram escassos ou sob investigação. Dessa forma, foi possível estabelecer poucas relações entre o potencial de virulência dos isolados clínicos e o estado geral do hospedeiro.

A tabela 6 mostra alguns resultados que não seguem rigidamente o modelo proposto pela literatura segundo a qual cepas com hemaglutininas MR estão relacionadas à pielonefrite e cepas com hemaglutininas MS à cistite. A cepa pielonefritogênica 17 não expressou hemaglutininas MR conforme o esperado, porém, foi hemolítica. TULLUS et al. (1991) encontraram significativa expressão de hemolisinas entre cepas de *E. coli* pielonefritogênicas. Enquanto que a cepa pielonefritogênica 18 não expressou nenhum dos fatores de virulência pesquisados. Segundo RUBIN e RUBIN (1997), cepas bacterianas pouco virulentas são características de processos infecciosos em pacientes imunocomprometidos, porém, nesta pesquisa faltaram dados que consubstanciassem esse fato. Contrariando essa premissa, a cepa 28, isolada de urina de paciente transplantado, presumivelmente imunodeprimido, expressou hemaglutininas e hemolisinas.

Constatou-se o isolamento de cepas de *E. coli* expressando adesinas manose-resistentes em exames de rotina, ou seja, exames solicitados segundo um protocolo pré-estabelecido. KÄLLENIUS et al. (1981) alertam que a ocorrência de cepas de *E. coli* manose-resistentes em cistites e infecções urinárias assintomáticas, pode ser um indicativo para um monitoramento mais rigoroso do paciente, com o objetivo de se

prevenir possível progressão do processo infeccioso para pielonefrite.

Várias condições ambientais afetam a expressão dos fatores de virulência *in vitro* e *in vivo*. As pesquisas ainda não são categóricas quanto ao mecanismo que rege o sistema imunológico do hospedeiro, ao potencial patogênico dos microrganismos e à relação existente entre ambos. Portanto, a interpretação dos achados laboratoriais deve ser acompanhada de rigoroso senso crítico. A ação conjunta de diversas áreas do conhecimento será necessária para elucidar quais são as estratégias empregadas por cepas bacterianas uropatogênicas para colonizar as superfícies mucosas do trato urinário e estabelecer o processo infeccioso. A partir desses conhecimentos, possivelmente se conseguirá elaborar agentes terapêuticos eficazes na prevenção e tratamento das infecções do trato urinário.

7 CONCLUSÕES

- 7.1 - A hemaglutinação foi o fator de virulência expresso pela maioria dos isolados.
- 7.2 - Todas as cepas bacterianas com hemaglutininas MR aderiram à linhagem celular HEp-2, corroborando as pesquisas que qualificam a hemaglutinação MR como um marcador de virulência bacteriana.
- 7.3 - As hemaglutininas MS foram as mais expressas pelos isolados, confirmando a sua distribuição ubíqua entre as bactérias.
- 7.4 - As cepas que expressaram unicamente MS apresentaram pouca capacidade adesiva, confirmando os dados da literatura.
- 7.5 - Cepas que não expressaram nenhuma das propriedades pesquisadas (hemaglutinação, adesão celular e hemólise) apontam para a necessidade de investigação de outros fatores de virulência.
- 7.6 - Houve associação significativa entre a produção de hemolisinas e hemaglutinação MS.
- 7.7 - As cepas hemolíticas e com fenótipo hemaglutinante MRMS produziram descolamento das monocamadas celulares das lamínulas em concentração aproximada de 6×10^8 UFC/mL.
- 7.8 - As cepas de *E. coli* uropatogênicas apresentaram padrões de aderência parecidos com aqueles relatados em cepas de *E. coli* diarreio gênicas: aderência difusa, aderência localizada e aderência agregativa.
- 7.9 - A interpretação dos resultados referentes ao fenômeno de descolamento das monocamadas celulares e em relação aos diferentes padrões de aderência celular requer estudos mais aprofundados, uma vez que essas propriedades são típicas de cepas de *E. coli* diarreio gênicas e ainda não se conhece a importância desses achados em cepas uropatogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALIA, I.; RODRIGUEZ, E.; UMARAN, A.; LACALLE, J.; SARASUA, A.; HUARTE, M.; RAMÓN BILBAO, J. Modulación de la fimbriación P por ciprofloxacina en *Escherichia coli* uropatógena. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, Barcelona, v. 15, p. 255-259, 1997.
- ALBERT, M. J.; ALAM, K.; ANSARUZZAMAN, M. ; MONTANARO, J.; ISLAM, M.; FARUQUE, S. M.; HAIDER, K.; BETTELHEIM, K.; TZIPORI, S. Localized adherence and attaching-effacing properties of nonenteropathogenic serotypes of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 59, n. 5, p. 1864-1868, May. 1991.
- ANDREU, A.; STAPLETON, A.E.; FENNELL C.; LOCKMAN, H.A.; XERCAVINS, M.; FERNANDEZ, F.; STAMM, W. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strain causing prostatitis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 176, p. 464-469, Aug. 1997.
- BASTOS, A.C.S.C.; SANTOS, L.B.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; YAMADA, A.T.; OLIVEIRA, U.M.; YANO, T. Role of Tam-Horsfall protein in the binding and *in vivo* phagocytosis of type 1 fimbriated *Escherichia coli* by mouse peritoneal macrophages. **Braz. J. Med. Bio. Res.** Ribeirão Preto , v. 34, p. 913-917. 2001.
- BLÁZQUEZ,R.; MENASALVAS.A.; CARPENA, I.; RAMÍREZ, C.; GUERRERO, C.; MORENO, S. Invasive disease caused by ciprofloxacina-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Munich, v.18, p. 503-505. 1999.
- BOUGUÉNEC, C.L.; LALIOUI, L.; MERLE, L.D.; JOUVE, M.; COURCOUX, P.; BOUZARI, S.; SELVANGAN, R.; NOWICKI, B.J.; GERMANI, Y., ANDREMONT, A., GOUNON, P., GARCIA, M. I. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n.5, p. 1738-1745, May. 2001.
- BRAATEN, B.A.; NOU, X.; KALTENBACH, L.S.; LOW, D.A. Methylation patterns in pap regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. **Cell**, Massachusetts, v. 76. p. 577-588, Feb. 1994.

- BRAGA, P.C.; PIATTI, G. Influence of enoxacin sub-MICs on the adherence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to human buccal and urinary epithelial cells. **Chemotherapy**, London, v. 38, n. 4, p. 261-266, July.-Aug. 1992.
- BREINES, D.M.; BURNHAM, J. C. Modulation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and adherence to uroepithelial cells following exposure of logarithmic phase cells to quinolones at subinhibitory concentrations. **J. Antimicrob. Chem.**, London, v. 34, p. 205-221, 1994.
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. **Biology of microorganisms**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall International, 1991.
- BROGDEN, K.A. Bacterial adherence, colonization, and invasion on mucosal surfaces. In: ROTH, J. A.; BOLIN, C. A.; BROGDEN, K. A.; MINION, F. C.; WANNEMUEHLER, M. J. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**. 2. ed. Washington: ASM Press, 1995. p. 3-33.
- CAMPBELL, J.M.; CAMPBELL, J. B. **Matemática de laboratório: aplicações médicas e biológicas**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1986.
- CARBALLAL, G.; OUBIÑA, J. R. **Virologia medica**. Buenos Aires: El Ateneo, 1991.
- CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; PALMEIRA, P.; SAMPAIO, M. MS C. Human colostrum Ig A antibodies reacting to enteropathogenic *Escherichia coli* antigens and their persistence in the faeces of a breastfed infant. Instituto Butantan. Disponível em : <http://www.icddrb.org/journal/jddr152/jddr152-53.html>> Acesso em 16 jul. 2000.
- CHICK, S.; HARBER, M. J.; MACKENZIE, R. ; ASSCHER, A. W. Modified method for studying bacterial adhesion to isolated uroepithelial cells and uromucoid. **Infect. Immun.**, Washington, v. 34, n. 1, p. 256-261, Oct. 1981.
- DONNENBERG, M.S.; WELCH, R.A. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In: MOBLEY, H.L.T.; WARREN, J.W. **Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management**. Washington: ASM Press, 1996. p. 135-174.
- DUGUID, J.P.; CLEGG, S.; WILSON, M.I. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 12, n. 2, p. 213-227, May. 1979.

- ECKFORD, S.D.; KEANE, D.P.; LAMOND, E.; JACKSON, S.R.; ABRAMS, P.
Hydration monitoring in the prevention of recurrent idiopathic urinary tract infections in pre-menopausal women. **Brit. J. Urol.**, Edimburgh, v. 76, p. 90-93, 1995.
- EDÉN, C.S.; HANSON, L.A.; JODAL, U.; LINDBERG, U.; ÅKERLUND, A.S.
Variable adherence to normal human urinary-tract epithelial cells of *Escherichia coli* strains associated with various forms of urinary-tract infection. **Lancet**, Londres, v. 4, p. 490-492, Sept. 1976.
- EDÉN, C.S. Bacterial adherence in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, Sweden, v. 20, p. 81-88, 1986.
- EISENSTEIN, B.I.; OFEK, I.; BEACHEY, E. Interference with the mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli* by sublethal concentrations of streptomycin. **J. Clin. Invest.**, v. 63, p. 1219-1228, June, 1979.
- FABREGA, V.L.A.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALESTKY, I.C.A. Pesquisa de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* que causam descolamento celular (CDEC) isoladas de crianças com diarreia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais**. Rio de Janeiro: Armazém das letras, 2001. p. 116.
- FINEGOLD, S.M. e BARON, E.J. **Bailey/Scott: diagnóstico microbiológico**. 7. ed. Buenos Aires: Panamericana, 1991.
- FIORENTINI, C.; DONELLI, G.; MATARRESE, P.; FABBRI, A.; PARADISI, S.; BOQUET, P. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p21 Rho GTPase. **Infect. Immun.**, Washington, v. 63, n. 10, p. 3936-3944, Oct. 1995.
- FOSTER, D.B.; PHILPOTT, D.; MILH, M.A.; HUESCA, M.; SHERMAN, P.M.; LINGWOOD, A. Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* host cell attachment. **Microb. Pathogenesis**, v. 27, p. 289-301, 1999.
- FOXMAN, B.; ZHANG, L.; TALLMAN, P.; ANDREE, B.C.; GEIGER, A.M.; KOOPMAN, J.S.; GILLESPIE, B. W.; PALIN, K.A.; SOBEL, J.D.; RODE, C.K.; BLOCH, C.A.; MARRS, C.F. Transmission of uropathogens between sex partners. **J. Inf. Dis.**, Chicago, v.175, p. 989-992, 1997.

- FÜNFSSTÜCK, R.; SMITH, J. W.; TSCHÄPE, H.; STEIN, G. Pathogenetic aspects of uncomplicated urinary tract infection: recent advances. **Clin. Nephrol.**, v. 47, n. 1, p.13-18, 1997.
- GBARAH, A.; GAHMBERG, C.G.; OFEK, I.; JACOBI, U.; SHARON, N. Identification of the leukocyte adhesion molecules CD11 and CD18 as receptor for type 1-fimbriated (mannose-specific) *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 59, n.12, p. 4524-4530, Dec. 1991.
- GEORGE, V.G.; HIERTROLZER, J.C.; ADES, E.W. Cell culture. In: MAHY, B.W.; KANGRO, H.O. **Virology methods manual**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 13.
- GIBBONS, R.J.; HOUTE, J. van. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 19, n. 44, p. 19-44, 1975.
- GOLUSZKO, P.; POPOV, V.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, S.; PHAM, T.; NOWICKI, B.J. Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule-dependent invasion to HeLa epithelial cell line. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 176, p. 158-167, Feb. 1997.
- GOMES, T.A.T.; ABE, C.M.; MARQUES, L.R.M. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of brazilian children. **J. C. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 12, p. 3364, 1995.
- GREEN, C.P.; THOMAS, V.L. Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production, and serogrouping of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis, and asymptomatic bacteriuria. **Infect. Immun.**, Washington, v. 31, n. 1 p. 309-315, Jan. 1981.
- HAARST, E.P. van; ANDEL, G. van; HELDEWEG, E.A.; SCHLATMANN, T.J.M.; HORST, H.J.R. van der. Evaluation of the diagnostic workup in young women referred for recurrent lower urinary tract infections. **Urology**, New York, v. 57, n. 6, p. 1068-1072, 2001.
- HAGBERG, L.; JODAL, U.; KORHONEN, T. K.; LIDIN-JANSON, G.; LINDBERG, U.; EDÉN, C. S. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Infect. Immun.** , Washington, v. 31, n. 2, p. 564-570, Feb. 1981.
- HUNT, J.; WALLER, G. The reliability of self-report of behaviours associated with recurrent urinary tract infection. **B. J. Urol.**, Edimburgh, v. 74, p. 308-310, 1994.

- IKÄHEIMO, R.; SHTONEN, A.; KÄRKKÄINEN, U.; KUOSMANEN, P.; MÄKELÄ, P. H. Characteristics of *Escherichia coli* in acute community-acquired cystitis of adult women. **Scad. J. Infect. Dis.**, Sweden, v. 25, p. 705-712, 1993.
- IKÄHEIMO, R.; SHTONEN, A.; KÄRKKÄINEN, U.; MUSTONEN, J.; HEISKANEN, T.; MÄKELÄ, P.H. Community-acquired pyelonephritis in adults: characteristics of *E. coli* isolates in bacteremic and non-bacteremic patients. **Scand. J. Infect. Dis.**, Sweden, v. 26, p. 289-296, 1994.
- IKÄHEIMO, R.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, T.; KÄRKKÄINEN, U.; KUOSMANEN, P.; LIPPONEN, P.; MÄKELÄ, P. H. Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women. **Clin. Inf. Dis.**, Chicago, v. 22, p. 91-99, 1996.
- JIAN, L.; FUSCO, P.C. Functional pilus-specific vaccine-induced antibodies for urinary tract infections. In: 40th INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 40, 2000, Toronto. **Abstracts**. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p. 251.
- JOHNSON, J. R.; STAPLETON, A. E.; RUSSO, T.A.; SCHEUTZ, F.; BROWN, J. J.; MASLOW, J. N. Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of pap G. **Infect. Immun.**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2153-2159, June. 1997a.
- JOHNSON, R.J.; RUSSO, T.A.; SCHEUTZ, F.; BROWN, J.J.; ZHANG, L.; PALIN, K.; RODE, C.; BLOCH, C.; MARRS, C.F.; FOXMAN, B. Discovery of disseminated J96-like strains of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing genes for both papG J96 (class I) and prsG J96 (class III) gal(alfa 1-4)gal- binding adhesins. **J. Inf. Dis.** Chicago, v. 175, p. 983-988. 1997b.
- JONES, C.H.; DODSON, K.; HULTGREN, S.J. Structure, function, and assembly of adhesive P pili. In : MOBLEY, H.L.T.; WARREN, J.W. **Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management**. Washington: ASM Press, 1996. p. 175-219.
- KÄLLENIUS, G.; SVENSON, S. B.; HULTBERG, H.; MÖLLBY, R.; HELIN, I.; CEDERGREN, B.; WINBERG, J. Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. **Lancet**, Londres, v. 19, n. 26, p. 1369-1372, Dec. 1981.
- KEITH, B.R.; HARRIS, S.L.; RUSSEL, P.W.; ORNDORFF, P.E. Effect of type 1 piliation on in vitro killing *Escherichia coli* by mouse peritoneal macrophages. **Infect. Immun.**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3448-3454, Oct. 1990.

- KISIELIUS, P.V.; SCHWAN, W.R.; AMUNDSEN, S.K.; DUNCAN, J.L.; SCHAEFFER, A.J. In vivo expression and variation of *Escherichia coli* type 1 and P pili in the urine of adults with acute urinary infections. **Infect. Immun.**, Washington, v. 57, p. 1656-1662, June. 1989.
- KORHONEN, T.K.; VIRKOLA, R.; WESTERLUND, B.; HOTHOFER, H.; PARKKINEN, J. Tissue tropism of *Escherichia coli* adhesions in human extraintestinal infections. **Curr. Top. Microbiol. Immun.**, v. 151, p. 115-127. 1990.
- KUEHN, M.J.; HEUSER, J.; NORMARK, S.; HULTGREN, S.J. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. **Nature**, New York, v. 356, p. 252-255, Mar. 1992.
- KUNIN, C.M. **Infecções urinárias: diagnóstico, tratamento, prevenção**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1991.
- LENNETTE, E.H.; LENNETTE, D.A.; LENNETTE, E.T. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. 7. ed. Washington: American Public Health Association, 1995.
- LENNETTE, E.H.; SPAULDING, E.H.; TRUANT, J.P. **Manual of clinical microbiology**. 2. ed. Washington : American Society for Microbiology, 1974.
- LIM, J.K.; GUNTHER IV, N.W.; ZHAO, H.; JOHNSON, D.E.; KEAY, S.K.; MOBLEY, H.L.T. In vivo phase variation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3303-3310, July, 1998.
- MARQUES, L.R.M.; ABE, C.M.; GRIFFIN, P.M.; GOMES, T.A.T. Association between alpha-hemolysin production and HeLa cell-detaching activity in fecal isolates of *Escherichia coli*. **J. C. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2707-2709, 1995.
- MOAYERI, M.; WELCH, R.A. Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, n. 10, p. 4124-4134, Oct. 1994.
- MOBLEY, H.L.T. Virulence of the two primary uropathogens. *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* exhibit distinct mechanisms of pathogenesis when causing urinary tract infections. **ASM News**, Washington, v. 66, n. 7, p. 403-410, July. 2000.

- MOBLEY, H.L.T.; WARREN, J.W. **Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management.** Washington: ASM Press, 1996.
- MÖLLBY, R.; KÄLLENIUS, G.; KORHONEN, T.K.; WINBERG, J.; SVENSON, S.B. P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: detection in clinical material by a rapid receptor-specific agglutination test. **Infection**, Munich, v. 11, n. 1, p. 80-84, Jan./Feb. 1983.
- MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 7. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1999.
- NATIONAL COMMITTEE FOR MEDICAL LABORATORY STANDARDS. **M7-A4: métodos de dilución para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias de crecimiento aeróbico, norma aprobada.** Wayne, 1997.
- NATIONAL COMMITTEE FOR MEDICAL LABORATORY STANDARDS. **M7-A5: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard.** Wayne, 2000.
- OFEK, I.; MOSEK, A.; SHARON, N. Mannose-specific adherence of *Escherichia coli* freshly excreted in the urine of patients with urinary tract infections, and isolates subcultured from the infected urine. **Infect. Immun.**, Washington, v. 34, n. 3, p.708-711, Dec. 1981.
- OFEK, I.; BEACHEY, E.H.; EISENSTEIN, B.I.; ALKAN, M.L.; SHARON, N. Suppression of bacterial adherence by subminimal inhibitory concentrations of beta-lactam and aminoglycoside antibiotics. **Rev. Infec. Dis.**, Chicago, v. 1, n. 5, p. 832-837, Sept.-Oct. 1979.
- O'GRADY, F.; CATTELL, W. R. Kinetics of urinary tract infection: the bladder. **Br. J. Urol.**, Edimburgh, v. 38, p. 156-162, 1966.
- ORNDORFF, P. E.; SPEARS, P. A.; SCHAUVER, D.; FALKOW, S. Two models of control of pil A, the gene encoding type 1 pilin in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 164, n.1, p.321-330, 1985.
- PARRY, S.H.; BOONCHAI, S.; ABRAHAM, S.N.; SALTER, J.M.; ROOKE, D.M.; SIMPSON, J.M.; BINT, A.J.; SUSSMAN, M. A comparative study of the mannose-resistant and mannose-sensitive haemagglutinins of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. **Infection**, Munich, v. 11, n. 2, p. 123-128, Mar/Apr. 1983.

- PARSONS, C.L.; POLLEN, J.J.; ANWAR, H.; STAUFFER, C.; SCHMIDT, J.D. Antibacterial activity of bladder mucin duplicated in the rabbit bladder by exogenous glycosaminoglycan (sodium pentosanpolysulfate). **Infect. Immun.**, Washington, v. 27, n. 3, p.876-881, Mar. 1980.
- PRADO, M.J.B.A.; NICASTRI, A.L.; COSTA, P.L.A.; ROCKMAN, T.; TERSARIOL, I.L.S.; NADER, H.B.; BARROS, R.T.; PRADO, E.B.A. The renal and hepatic distribution of Bence Jones proteins depends on glycosylation: a scintigraphic study in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** Ribeirão Preto, v. 30, p. 865-872, 1997.
- REID, G.; BROOKS, H.J.L.; BACON, D.F. *In vitro* attachment of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells: variation in receptivity during the menstrual cycle and pregnancy. **J. Inf. Dis.**, Chicago, v. 148, n. 3, p. 412-421, Sep. 1983.
- RHEN, M.; KNOWLES, J.; PENTTILÄ, M.E.; SARVAS, M.; KORHONEN, T. K. P fimbriae of *Escherichia coli*: molecular cloning of DNA fragments containing the structural genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 19, p. 267-271, 1983.
- ROBERTS, J.A.; MARKLUND, B.I.; ILVER, D.; HASLAM, D.; KAACK, M. B.; BASKIN, G.; LOUIS, M.; MÖLLBY, R.; WINBERG, J.; NORMARK, S. The gal (alfa 1 – 4) gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is need for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 11889-11893, Dec. 1994.
- ROBERTS, J.A. Bacterial adherence and urinary tract infection. **Southern Med. J.**, v. 80, n. 3, p. 347-351, Mar. 1987.
- ROTH, J.A.; BOLIN, C.A.; BROGDEN, K.A.; MINION, F. C.; WANNEMUHLER, M.J. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**. Washington: American Society for Microbiology, 1995.
- RUBIN, N.E.T.; RUBIN, R.H. Urinary tract infection in the immunocompromised host. **Infec. Dis. Clin. North Am.**, v. 11, n. 3, p. 707-717, Sep. 1997.
- SANDBERG, T.; STENQVIST, K.; SVANBORG-EDÉN, C. Effects of subminimal inhibitory concentrations of ampicillin, chloramphenicol, and nitrofurantoin on the attachment of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells *in vitro*. **Rev. Infec. Dis.**, Chicago, v. 1, n. 5, p. 838-844, Sep.-Out. 1979.
- SCALETISKY, I.C.A.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, Washington, v. 45, n. 2, p. 534-536, Aug. 1984.

- SERVICE, R. F. New vaccines may ward off urinary tract infections. **Science**, Washington, v. 276, p. 533, Apr. 1997.
- SOKURENKO, E. V.; CHESNOKOVA, V.; DOYLE, R. J.; HASTY, D.L. Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. **J. Bacteriol. Chem.**, v. 272, n. 28, p. 17880-17886, 1997.
- SONSTEIN, A.S.; BURNHAM, J.C. Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 16, p. 277-289, 1993.
- STAPLETON, A. Prevention of recurrent urinary-tract infections in women. **Lancet**, Londres, v. 353, p. 7-8, Jan. 1999.
- STAPLETON, A.; STROUD, M.R.; HAKOMORI, S.I.; STAMM, W.E. The globoseries glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside is found in urinary tract tissues and is a preferred binding receptor in vitro for uropathogenic *Escherichia coli* expressing pap-encoded adhesins. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3856-3861, Aug. 1998.
- SUGARMAN, B.; EPPS, L.R.; STENBACK, W.A. Antibiotic and nonantibiotic ionophores can alter bacteria adherence to mammalian cells. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, v.173, p. 588-597, 1983.
- Zinc and bacterial adherence. **Infect. Immun.**, Washington, v. 37, n. 3, p. 1191-1199, 1982.
- SVANBORG, C.; GODALY, G. Bacterial virulence in urinary tract infection. **Infec. Dis. Clin. North. Am.**, v. 11, n. 3, p. 513-529, Sep. 1997.
- TOBE, T.; SASAKAWA, C. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence in microcolony development. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 579-585, 2001.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiology: an introduction**. 5. ed. California: The Benjamin/Cummings, 1995.
- TULLUS, K.; JACOBSON, S. H.; KATOULI, M.; BRAUNER, A. Relative importance of eight virulence characteristics of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains assessed by multivariate statistical analysis. **J. Urol.**, Baltimore, v. 146, p. 1153-1155, Oct. 1991.

- VÄISÄNEM, V.; LOUNATMAA, K.; KORHONEN, T. K. Effects of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination, adhesion, and ultrastructure of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 22, n. 1, p. 120-127, July, 1982.
- VOSBECK, K.; HANDSCHIN, H.; MENGE, E. B. ; ZAK, O. Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on adhesiveness of *Escherichia coli* *in vitro*. **Rev. Infest. Dis.** , Chicago, v. 1, n. 5, p. 845-851, Sep. 1979.
- VOSBECK, K.; METT, H.; HUBER, U.; BOHN, J.; PETIGNAT, M. Effects of low concentrations of antibiotics on *Escherichia coli* adhesion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.21, n. 6, p. 864-869, June 1982.
- WARREN, J. W. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In: MOBLEY, H.T.; WARREN, J.W. **Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management**. Washington: ASM Press, 1996, p.3-27.
- WU, XUE-RU; SUN, TUNG-TIEN; MEDINA, J. J. In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 9630-9635, Sep. 1996.
- ZAK, O.; KRADOLFER, F. Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics in experimental infections. **Rev. Infec. Dis.**, Chicago, v. 1. n. 5, p. 862-879, Sept.-Oct. 1979.