



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Caracterização fenotípica e molecular de isolados de
Escherichia coli uropatogênica provenientes de pacientes no
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu**

Rodrigo Hideki Souza Tanabe

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Camargo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de
Parasitas e Microrganismos*.

Rodrigo Tavanelli Hernandes

BOTUCATU – SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tanabe, Rodrigo Hideki Souza.

Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Escherichia coli* uropatogênica obtidos de pacientes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu / Rodrigo Hideki Souza Tanabe. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandes

Coorientador: Carlos Henrique Camargo

Capes: 21201021

1. Trato urinário - Infecções. 2. *Escherichia coli*.
3. beta-Lactamases. 4. Resistência microbiana a medicamentos.

Palavras-chave: Beta-lactamase de espectro estendido;
Escherichia coli uropatogênica; Infecção do trato urinário;
Resistência a antimicrobianos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes, por me orientar em todos os momentos desta dissertação de mestrado. Pelo seu conhecimento e pela convivência no desenvolvimento do mestrado, na presença no laboratório, todos os dias. Muito Obrigado.

À todos os meus familiares e amigos, que me apoiaram, motivaram e incentivaram.

Ao Prof^o Dr. Carlos Henrique Camargo por aceitar ser meu coorientador e por todo auxílio fornecido durante o desenvolvimento do projeto.

Aos meus companheiros/amigos de laboratório Melissa Arruda Vieira, Regiane Chrysostomo Bitencort Dias, Henrique Orsi pelo companheirismo, risadas, alegrias. A todos vocês muito obrigado pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa. Muito Obrigado.

À Cefar, pela doação dos discos de antibióticos utilizados nessa pesquisa.

À CAPES, pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados dos pacientes com diagnóstico clínico de infecção do trato urinário.	10
Tabela 2. Sequencias empregadas para a pesquisa de marcadores de virulência associados a patogenicidade de isolados de ExPEC.	12
Tabela 3. Sequencias de iniciadores empregados para a pesquisa de marcadores dos patotipos EPEC e EAEC.	13
Tabela 4. Sequências empregadas para a pesquisa de marcadores de virulência associados à patogenicidade de isolados de EAEC.....	14
Tabela 5. Sequências empregadas para a detecção dos principais determinantes genéticos associados à produção de ESBL.	16
Tabela 6. Associação entre faixa etária dos pacientes e os isolados de UPEC classificados nos distintos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	18
Tabela 7. Distribuição de genes codificadores de fatores de virulência em isolados de UPEC identificados nos distintos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	19
Tabela 8. Isolados de UPEC com marcadores de DEC.....	20
Tabela 9. Características dos isolados de UPEC com marcadores de EAEC e EPEC	22
Tabela 10. Marcadores de virulência associados à patogenicidade de EAEC pesquisados nos isolados UPEC com os genótipos <i>aatA</i> +/ <i>aggR</i> + e <i>aatA</i> -/ <i>aggR</i> -.....	23
Tabela 11. Frequência de resistência dos isolados de UEPC frente à 19 drogas antimicrobianas testadas.	24
Tabela 12. Características dos isolados produtores de betalactamases de espectro estendido.	25
Tabela 13. Relação dos antimicrobianos de isolados multirresistentes.....	26

Lista de abreviações

- DEC.....*Escherichia coli* diarreiogênica
- EPEC.....*Escherichia coli* enteropatogênica
- EAEC.....*Escherichia coli* enteroagregativa
- UPEC.....*Escherichia coli* uropatogênica
- ExPEC....*Escherichia coli* extra-intestinal
- ITU.....Infecção do trato urinário
- PCR.....Reação em cadeia de polimerase
- CBI.....Comunidade bacteriana intracelular
- EIEC.....*Escherichia coli* enteroinvasora
- EHEC.....*Escherichia coli* enterohemorrágica
- ETEC.....*Escherichia coli* enterotoxigênica
- DAEC....*Escherichia coli* de aderência difusa
- CNF1....Fator necrosante citotóxico 1
- AA.....Adesão agregativa
- ESBL....Beta-lactamase de espectro estendido
- EPM.....Escola Paulista de Medicina
- UFC.....Unidade formadora de colônia

Sumário

1. Resumo	1
2. Abstract	2
3. Introdução	3
4. Objetivos	9
5. Material e Métodos	10
<i>5.1 Isolamento e identificação de Escherichia coli</i>	10
<i>5.2 Detecção de fatores de virulência associados à patogenicidade de ExPEC</i>	10
<i>5.3 Detecção de marcadores diagnósticos para os patotipos EPEC e EAEC</i>	13
<i>5.4 Detecção de fatores de virulência associados à patogenicidade de EAEC</i>	13
<i>5.5 Classificação filogenética</i>	14
<i>5.6 Cultura de células HeLa e determinação do padrão de aderência</i>	14
<i>5.7 Teste de identificação da polimerização de actina</i>	15
<i>5.8 Teste de susceptibilidade antimicrobiana</i>	15
<i>5.9 Produção de Beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL) e detecção dos principais determinantes genéticos associados a esse fenótipo</i>	16
6. Resultados	17
7. Discussão	28
8. Conclusão	33
9. Referências	34

1. Resumo

Escherichia coli uropatogênica (UPEC) causa a maioria das infecções do trato urinário (ITU), incluindo cistite e pielonefrite, no hospedeiro humano. A UPEC utiliza numerosos fatores de virulência para entrar, aderir, colonizar, adquirir nutrientes essenciais, multiplicar e causar danos ao ambiente do trato urinário. Estudos recentes demonstraram que alguns isolados de UPEC carregam fatores de virulência associados à patótipos diarréio-gênicos de *E. coli* (DEC), como EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e EPEC (*E. coli* enteropatogênica). Uma grande preocupação nas infecções por UPEC é o aumento da resistência antimicrobiana, levando à falha do tratamento em algumas ITUs causadas por esse patógeno. Nesse estudo, um total de 118 isolados de UPEC de amostras ambulatoriais de urina de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina de Botucatu entre março e maio de 2018. Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para detectar 29 genes que codificam fatores de virulência, bem como marcadores de DEC (*escN*, *stx1/2*, *aatA* e *aggR*); além de genes que codificam adesinas e toxinas associadas ao patótipo EAEC. Os isolados de UPEC foram designados nos diferentes filogrupos de *E. coli*, utilizando um PCR quadruplex; e a determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi realizada pelo método de disco difusão. Entre os isolados estudados, 39,8% foram atribuídos ao filogrupo B2, enquanto UPEC dos filogrupos B1 (14,4%), A (14,4%), D (12,7%), F (8,5%), G (3,4%), E (2,5%), *E. clades* (2,5%) e C (1,7%) também foram observados. Entre os genes codificadores de virulência pesquisados, *fimH* (98,3%), *ecpA* (78,0%), *traT* (82,2%) e *ompT* (62,4%) foram os mais frequentes. Os genes utilizados para a identificação de EAEC (*aatA* e *aggR*) e EPEC (*escN*) foram identificados em cinco (4,2%) e um (0,8%) dos isolados de UPEC, respectivamente. As maiores taxas de resistência foram observadas para os seguintes antimicrobianos: ampicilina (45,8%), cotrimoxazol (34,7%) e ácido nalidíxico (32,2%). Foram identificados 11,8% isolados de UPEC estudados confirmados como produtores de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Genes responsáveis por codificar ESBL foram detectados em 78,6% dos isolados de UPEC-ESBL+, sendo esses: *bla_{CTX-M-15}* (42,9%), *bla_{CTX-M-8}* (21,4%), e *bla_{CMY2}* (14,3%). Entre os isolados estudados, 16,1% apresentaram o fenótipo de multirresistência. Entre os isolados de UPEC classificados como multirresistentes 73,7% apresentaram resistência aos antimicrobianos pertencentes às classes dos betalactâmicos, das quinolonas e dos inibidores da via folato. Também foi observado que entre os isolados de UPEC multirresistentes, 52,6% foram capazes de produzir ESBL. Em conclusão, observamos que os isolados UPEC atribuídos ao filogrupo B2 abrigavam um maior número de genes codificadores de virulência que podem auxiliar na colonização e sobrevivência no trato geniturinário. Além disso, o número de isolados de UPEC não susceptíveis aos antimicrobianos testados, pode servir como um alerta para os profissionais da área da saúde, a fim de selecionar de maneira mais adequada o tratamento a ser usado nas ITUs.

Palavras chave: Resistência a antimicrobianos, betalactamase de espectro estendido, infecção do trato urinário, *Escherichia coli* uropatogênica.

2. Abstract

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) cause the majority of urinary tract infections (UTIs), including cystitis and pyelonephritis, in the human host. UPEC utilizes numerous virulence factors to entry, adhere, colonize, acquire essential nutrients, multiply and cause damage in the urinary tract environment. Recent studies have shown that some UPEC isolates carry virulence factors associated with the diarrheagenic *E. coli* (DEC) pathotypes, such as EAEC (enteroaggregative *E. coli*) and EPEC (enteropathogenic *E. coli*). A major concern in UPEC infections is the constant increasing of antimicrobial resistance, thus leading to treatment failure in some UTIs caused by this pathogen. In this study a total of 118 UPEC isolates were obtained from outpatient urine samples, attended at University Hospital of Botucatu Medical School between March and May of 2018. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect 29 virulence factor-encoding genes, diarrhoeagenic *E. coli* markers, (*escN*, *stx1/2*, *aatA* and *aggR*), as well as genes encoding adhesins and toxins associated with the EAEC pathotype. The UPEC isolates were assigned in the distinct *E. coli* phylogroups, using a quadruplex PCR; and the determination of the antimicrobial resistance profile was performed using the disk-diffusion method. Among the isolates studied, 39.8% were assigned to phylogroup B2, while UPEC isolates from other phylogroups were detected as follows: B1 (14,4%), A (14,4%), D (12,7%), F (8,5%), G (3,4%), E (2,5%), *E. clades* (2,5%) and C (1,7%). Among the virulence-encoding genes searched, *fimH* (98,3%), *ecpA* (78,0%), *traT* (82,2%) and *ompT* (62,4%) were the most frequent detected. Genes used for the identification of EAEC (*aatA* and *aggR*) and EPEC (*escN*) were identified in five (4.2%) and one (0.8%) of the UPEC isolates, respectively. The highest resistance rates were observed for the following antimicrobials drugs: ampicillin (45,8%), trimethoprim-sulfamethoxazole (34.7%) and nalidixic acid (32.2%). Among the isolates studied, 11.8% were confirmed as Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers. The genes responsible for encoding ESBL were detected in 78.6% of the UPEC-ESBL +as follow: *bla_{CTX-M-15}* (42.9%), *bla_{CTX-M-8}* (21.4%) and *bla_{CMY2}* (14 3%). Among those studied, 16.1% had the multidrug resistance phenotype. Most UPEC isolates with multidrug resistant (73.7%) are resistant to antimicrobials belonging to the classes of betalactams, quinolones and folate inhibitors. We could also observe that among the multidrug resistant UPEC isolates, 52.6% were able to produce ESBL. In conclusion, we observed that UPEC isolates assigned to the phylogroup B2 harbored a higher number of virulence-encoding genes that can assist in the colonization and survival in the genitourinary tract. Also, the increase of the number of UPEC isolates nonsusceptibility to some of the antimicrobial drugs tested, may serve as an alert for the physicians in order to better select the treatment to be used in the UTIs.

Keywords: Antimicrobial resistance, extended spectrum betalactamase, urinary tract infection, uropathogenic *Escherichia coli*.

3. Introdução

E. coli uropatogênica (UPEC) é um dos principais agentes causadores de doenças como cistites, pielonefrites, bacteriúria assintomática e prostatite [Foxman, 2010]. Alguns dos fatores de risco são: a faixa etária, a uretra curta, a proximidade ao ânus (característica do sexo feminino), a gravidez, implante de sondas vesicais, alteração urológica de origem anatômica ou funcional, entre outros [Terlizzi *et al.*, 2017; Foxman 2014]. A ocorrência de refluxo da urina contaminada para os ureteres pode levar à pielonefrite que, diferentemente das cistites não complicadas, pode induzir morbidade e mortalidade [Terlizzi *et al.*, 2017; Nuutinen *et al.*, 2001; Tolg *et al.*, 2002].

Atualmente, projeta-se a ocorrência anual de, pelo menos, 200 milhões de casos de infecções do trato urinário humano em todo o mundo, sendo 80% dessas infecções causadas por UPEC, e a grande maioria, ocorrendo em indivíduos do sexo feminino [Stamm, 2002]. *E. coli* é o agente etiológico de 90 % das infecções de origem comunitária e de cerca de 50 % das infecções hospitalares que acometem o trato urinário [Foxman, 2014]. As infecções do trato urinário (ITUs) também são frequentes entre os neonatos do sexo masculino, aonde a não circuncisão é um fator de risco [Stamm *et al.*, 1993]. Entre as crianças maiores, as meninas são as mais frequentemente acometidas [Stamm *et al.*, 1989]. As ITUs são as infecções mais frequentes também em mulheres grávidas [Stamm, 2002]. Os fetos de mulheres que apresentam pielonefrite nos primeiros meses de gestação têm grande risco de morte ou de graves sequelas pós-nascimento [Flores-Mireles *et al.*, 2015]. Nos idosos sadios a bacteriúria assintomática ocorre em até 25% dos indivíduos e, cerca de, 10% destes terá evolução sintomática [Stamm, 2002]. Outros fatores de risco para a ocorrência de ITUs são: danos na medula, diabetes, esclerose múltipla, cateteres urinários, HIV/AIDS, hipertrofia de próstata e anormalidades urológicas [Foxman, 2014; Tabasi *et al.*, 2016].

ITUs são causadas tanto por bactérias Gram-negativas como por bactérias Gram-positivas, e por alguns fungos. Entre os agentes envolvidos em ITUs não complicada, podemos destacar: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* do grupo B, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.* [Foxman, 2014; Kline *et al.*, 2011]. Para ITUs complicadas, os agentes causadores mais comuns são: *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *Candida spp.*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus* do grupo B [Levison *et al.*, 2013; Jacobsen *et al.*, 2008]. A *E. coli* é o agente causador mais comum para ambos os tipos de ITUs [Nielubowicz *et al.*, 2010].

E. coli é um microorganismo presente na microbiota do intestino humano; no entanto, às vezes são responsáveis por causar infecções intestinais e extra-intestinais, sendo a *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) um dos principais agentes etiológicos de bacteremia causada por bacilos Gram-negativos [Koga *et al.*, 2014]. ExPEC responsáveis por ITUs são denominadas *E. coli* uropatogênica, sendo diferenciados dos isolados comensais e diarreio gênicos em relação aos grupos filogenéticos a que pertence, bem como, com relação aos fatores de virulência que albergam [Kaper *et al.*, 2004]. Os isolados comensais e diarreio gênicos pertencem principalmente aos grupos filogenéticos A e B1 [Moreno *et al.*, 2005, Santos *et al.*, 20013], enquanto a maioria dos isolados de ExPEC se enquadram no grupo B2 e, mais raramente, nos grupos D e F [Paiva *et al.*, 2013].

ExPEC apresenta uma grande variedade de genes que codificam fatores de virulência, os quais tem a propriedade de codificar proteínas, que podem contribuir para a patogenicidade desses isolados, tais como: adesinas (*fimH*, *papA*, *papC*, *afaBC*, *sfaDE*, *ecpA*, *iha*, *bmaE*, *hra*), invasinas (*ibe10*), sistemas de captação de ferro (*iron*, *irp2*, *iucD*, *ireA*, *sitA*), protactinas (*traT*, *ompT*, *iss*, *kpsMTII*, *cva*) e toxinas (*hlyA*, *cnf1*, *cdt*, *sat*, *vat*, *usp*, *hlyF*, *tsh*) [Tabasi *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 20013; Cyويا *et al.*, 2015]. Essas propriedades encontram-se codificadas em determinantes genéticos variados, e um único isolado pode apresentar diversos determinantes codificando para a mesma propriedade [Bélanger *et al.*, 2011]. Dessa forma, as ExPEC podem possuir múltiplas adesinas, sideróforos, sistemas de escape das defesas do hospedeiro, que são expressas de forma coordenada para que a bactéria possa avançar no interior do hospedeiro até alcançar o seu sítio alvo [Terlizzi *et al.*, 2017].

Isolados de UPEC empregam fímbrias do tipo chaperonina/usher, tais como: fímbria do tipo I, fímbria P e fímbria F1C para aderir e invadir as células do epitélio urinário, colonizando o hospedeiro [Krogfelt *et al.*, 1990].

A fímbria tipo 1 é um polímero com cerca de 100 unidades de pilina (FimA), uma proteína contendo aminoácidos hidrofóbicos. A estrutura fimbrial apresenta tipos sorológicos diversos sendo codificada por um cluster contendo nove genes cuja expressão é regulada pelo fenômeno de variação de fase, por ação dos genes *fimB* e *fimE* [Krogfelt *et al.*, 1990]. Os genes *fimA*, *B*, *C* e *D* são estruturais, enquanto *fimF*, *G* e *H* estão envolvidas com a aderência [Krogfelt *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 2000]. A proteína apical FimH adere-se especificamente a resíduos de manose, em especial monomanose presente no epitélio vaginal e da bexiga, além de auxiliar na colonização, a fímbria tipo 1 promove a formação de biofilmes e invasão celular. [Jones *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 2002]. A Invasão permite os isolados de UPEC evitar certas defesas do hospedeiro e tornando-os resistentes para tratamentos com

antibióticos. Um mecanismo de expulsão, depende da expressão do receptor *toll-like 4* (TLR4), defende o uroepitélio da invasão por UPEC. Entretanto, isolados de UPEC podem evitar essa expulsão e multiplicar-se rapidamente, formando comunidades bacterianas intracelulares (CBIs) transitórias que são semelhantes a biofilmes [Anderson *et al.*, 2003]. Após o crescimento bacteriano os isolados de UPEC se dispersam do CBI para invadir outras células, aonde o ciclo se repete. A formação CBI é um mecanismo comum para isolados clínicos de UPEC e observado em células uroepiteliais esfoliadas na urina de pacientes com ITUs agudas [Flores-Mireles *et al.*, 2015].

Fímbria P possui especificidade de ligação aos resíduos de galactobiose que compõem os glicoesfingolipídeos. Sua morfologia é muito semelhante a fímbria tipo 1; e os 11 genes envolvidos na biogênese das fímbrias P são designados *pap* (*pyelonephritis associated pili*) devido à sua associação com isolados de pielonefrite [Svanborg *et al.*, 1987]. A proteína PapA compõe a estrutura fimbrial básica, e as proteínas PapE, F e G, apicais, são essenciais para a adesão, tendo PapG como proteína responsável pela ligação ao receptor celular, com três variantes genéticas do gene *papG*, uma delas, *papGII*, é prevalente entre as cepas pielonefritogênicas e bacteriêmicas, enquanto *papGIII* associa-se às prostatites e cistites [Johnson *et al.*, 2002; Kuehn *et al.*, 1992].

A adesina F1C são fímbrias não hemaglutinantes, que promovem a adesão da bactéria às células epiteliais dos rins, ureteres e bexiga que, em resposta, produzem a citocina pró-inflamatória IL-8 [Bäckhed *et al.*, 2002]. O operon *foc* é composto de seis genes envolvidos na biogênese de F1C, embora tenham similaridade genética com os genes *sfa* da fímbria S, seus receptores não são os mesmos. F1C liga-se a ceramidas diversas (glucosilceramidas, galactosilceramidas, lactosilceramidas, entre outras) cuja composição determinará a especificidade da ligação [Bäckhed *et al.*, 2002].

O flagelo em UPEC permite que as bactérias se movam de forma ascendente no trato urinário, desde a bexiga até os rins. A expressão coordenada das fímbrias tipo1, P e do flagelo, nas diversas etapas da infecção, permite que a bactéria alcance os rins [Lane *et al.*, 2005].

A fímbria S possui atividade hemaglutinante e foi descoberta em isolados de *E. coli* isoladas de pielonefrite. Seu nome advém da especificidade de ligação por galactosídeos contendo ácido siálico. A proteína SfaS é a responsável pela ligação ao receptor celular [Moch *et al.*, 1987; Schmoll *et al.*, 1989]. Um conjunto de sete genes está envolvido na biogênese das fímbrias S. Os genes *sfa* (*S fimbrial adhesins*) parecem ter sua expressão regulada por fatores ambientais, tais como, temperatura, osmolaridade e concentração de glicose. Além de ocorrer

em cerca de 50 % dos isolados de UPEC, em particular, os obtidos de pielonefrite aguda [Morschhäuser *et al.*, 1993; Foxman *et al.*, 1995].

Três tipos principais de toxinas são produzidos por UPEC: hemolisina, fator necrosante citotóxico 1 (CNF1) e toxinas autotransportadoras [Boehm *et al.*, 1990]. A alfa-hemolisina é uma exotoxina codificada pelo operon *hlyCABD* que, ao aderir-se a célula alvo, insere-se na membrana citoplasmática formando poros que facilitam a liberação de nutrientes e íons ferro. Tem especificidade para uma variedade de tipos celulares como: hemácias, fibroblastos, granulócitos, linfócitos e macrófagos. A ação sobre as células fagocíticas permite que a bactéria escape das defesas do hospedeiro. No decurso da infecção por UPEC, a HlyA pode auxiliar na apoptose e esfoliação do uroepitélio, favorecendo a disseminação bacteriana [Trifillis *et al.*, 1994].

CNF1, fator citotóxico necrotizante tipo1, é uma toxina com ação necrotóxica em diversos tecidos do hospedeiro, codificada por um único gene (*cnf1*) [Boquet *et al.*, 2001]. A CNF1, após ligar-se ao seu receptor na célula alvo, sofre endocitose e libera sua parte catalítica no citosol, promovendo a reorganização do citoesqueleto de actina de células epiteliais cultivadas *in vitro*, por meio da ativação permanente de Rho GTPases, com consequente modificação de várias propriedades funcionais das células. Na bexiga, CNF1 contribui para a invasão do epitélio da célula bacteriana, promovendo as infecções urinárias recorrentes [Lemonnier *et al.*, 2007].

Proteínas autotransportadoras como a proteína Sat (toxina autotransportadora secretada) é uma serinoprotease que medeia os efeitos citopáticos na bexiga em linhagens celulares renais cultivadas *in vitro*, e promove danos nos tecidos [Parham *et al.*, 2004; Heimer *et al.*, 2004]. Hemaglutinina sensível à temperatura (Tsh) não exibe atividade de serina-protease e parece ser mais relacionado ao Vat, uma toxina autotransportadora vacuolar encontrada em *E. coli* patogênica aviária [Heimer *et al.*, 2004].

O ferro, um nutriente essencial para todos os seres vivos, é disputado pelas células do hospedeiro e pelos patógenos bacterianos, UPEC não é exceção, e o seu genoma contém pelo menos 10 sistemas caracterizados de absorção de ferro e vários transportadores, promovendo uma concorrência pelo recurso [Welch *et al.*, 2012]. Um exemplo é o sideróforo enterobactina que representa um mecanismo de aquisição de ferro. No entanto, a proteína hospedeira lipocalina 2, que é expressa e liberada por neutrófilos, liga-se e sequestra a enterobactina, tornando-a incapaz de fornecer o ferro para a célula bacteriana. UPEC, entretanto é capaz de modificar a enterobactina por glicosilação, produzindo salmochelina que não é reconhecida e sequestrado pela lipocalina 2, permitindo assim, seu escape do mecanismo de defesa do

hospedeiro mediado por lipocalina 2 [Hantke *et al.*, 2003]. A captação de heme, enterobactina e outros sideróforos contribuem para o estabelecimento da UPEC durante a infecção [Snyder *et al.*, 2004; Hagan *et al.*, 2010].

A combinação de fatores de virulência presentes em isolados distintos de *E. coli*, características sorológicas e doenças que causam são utilizados como determinantes para a classificação dos diferentes patótipos de *E. coli* diarreio gênica (DEC), sendo esses isolados dividido em seis grupos patogênicos bem definidos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). Estudos mais recentes, de caracterização molecular, têm demonstrado que marcadores de virulência podem transitar entre os diferentes grupos patogênicos, assim ocorrendo novas combinações de virulência. [Kaper *et al.*, 2004; Rasko *et al.*, 2008; Kaper *et al.*, 2014; Lara *et al.*, 2017].

Escherichia coli enteroagregativa compreende a categoria de DEC caracterizada por apresentar um padrão de adesão denominado adesão agregativa (AA), aonde as bactérias se apresentam aderidas umas às outras formando uma configuração que lembra tijolos empilhados [Nataro *et al.*, 1987]. Até o momento foram descritas cinco fimbrias agregativas (AAF) responsáveis por mediar o padrão AA na aderência de isolados do patótipo EAEC as células epiteliais cultivadas *in vitro*. Essas fimbrias são denominadas: AAF/I, AAF/II, AAF/III, AAF/IV e AAF/V [Nataro *et al.*, 1992; Czczulin *et al.*, 1999; Boisen *et al.*, 2008; Jønsson *et al.*, 2015]. *E. coli* são classificadas como EAEC caso sejam portadoras do plasmídeo de virulência pAA que alberga os genes *aatA* e *aggR*, podendo também albergar outros genes de virulência específicos de EAEC (*aggA*, *aafA*, *agg3A*, *agg4A*, *agg5A*, *pet*, *aap*) [Lara *et al.*, 2017].

A plasticidade do genoma apresentada pela espécie *E. coli* é um dos fatores que levou ao surgimento de isolados com um arranjo de fatores de virulência incomum, sendo identificados fatores de virulência de diferentes patótipos em único isolado. Isolados de UPEC apresentando marcadores de virulência originalmente descritos no patótipo EAEC, assim como o padrão AA em células epiteliais cultivadas *in vitro*, tem sido observados [Abe *et al.*, 2008; Toval *et al.*, 2014; Aurass *et al.*, 2011; Olesen *et al.*, 2011; Prager *et al.*, 2014; Ang *et al.*, 2016].

Um fator importante é o aumento de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae que apresentam resistência a antibióticos, incluindo a bactéria *E. coli*. Estas situações são de grande importância principalmente em países em desenvolvimento onde enteropatógenos são causas de infecções frequentes, incluindo as infecções do trato urinário, que podem levar a morte [Talukdar *et al.*, 2013]. Ciprofloxacina têm sido o antimicrobiano mais amplamente

utilizado nas últimas décadas [Hopkins *et al.*, 2015], sendo o principal antimicrobiano utilizado para o tratamento de infecções urinárias, incluindo as pielonefrites [Oliphant *et al.*, 2002]. As quinolonas inibem a síntese de DNA bacteriano e, em concentrações elevadas, inibem também a síntese de RNA. Esses efeitos são mediados pela habilidade destes compostos em desestabilizar o complexo formado entre o DNA e a DNA girase [Hooper, 2001].

A definição de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) não é precisa, geralmente são definidas como beta-lactamases que hidrolisam o anel beta-lactâmico penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, inativando assim esses antibióticos [Paterson *et al.*, 2005]. ESBLs são encontrados principalmente nas espécies *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* [Ambler *et al.*, 1991]. A classificação das ESBLs pode ser realizada através de dois sistemas: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros [Ambler *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1995]. No sistema de Ambler, as beta-lactamases são divididas em quatro classes, as classes A, C e D são constituídas de serina-betalactamases e da classe B são compostas por metalo-betalactamases [Ambler *et al.*, 1991]. A classificação pelo sistema de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as beta-lactamases de acordo com a similaridade funcional destas enzimas, sendo este sistema mais relevante para o diagnóstico laboratorial, visto que este sistema leva em consideração os inibidores e substratos das betalactamases [Paterson *et al.*, 2005; Bush *et al.*, 1995]. Os genes responsáveis por codificar estas enzimas podem estar presentes no cromossomo, ou podem ser plasmidiais com o potencial de transitarem entre populações bacterianas [Dhillon *et al.*, 2012]. Existem vários genótipos de ESBLs clinicamente importantes, os genótipos SHV, TEM e CTX-M são encontrados com maior frequência [Rupp *et al.*, 2003]. O maior grupo de ESBLs são os CTX-Ms cujo nome é proveniente da sua potente atividade hidrolítica contra cefotaxima. CTX-M foi identificado primariamente na Alemanha, França e América do Sul, ocorrendo um aumento da sua prevalência desde 2000, os genótipos mais predominantes são *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{CTX-M2} e *bla*_{CTX-M14} [Bevan *et al.*, 2017]. As ESBLs do tipo TEM são derivadas do TEM-1 e TEM-2, TEM-1 é capaz de hidrolisar a ampicilina a uma taxa maior que a carbenicilina, oxacilina ou cefalotina e tem atividade desprezível contra as cefalosporinas de espectro estendido sendo inibido pelo ácido clavulânico. TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico que TEM-1, mas difere de TEM-1 por ter um promotor nativo mais ativo e por uma diferença no ponto isoelétrico [Datta *et al.*, 1965; Jacoby *et al.*, 1991]. ESBLs do tipo SHV foram detectadas em várias bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e surtos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Actinobacter ssp.* produtoras de SHV foram reportados [Huang *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2004]. A prevalência de isolados de UPEC produtores de ESBLs aumentou significativamente na última década, ficando o tratamento dessas infecções bastante

complicado devido à resistência desses isolados a várias classes de antimicrobianos, incluindo: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e trimetoprim/sulfametoxazol [Falagas *et al.*, 2009].

4. Objetivo

Esse estudo teve como objetivo caracterizar molecular e fenotipicamente isolados de UPEC, obtidos de amostras de urina provenientes de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, quanto aos seus principais determinantes de virulência, bem como seu perfil de resistência aos principais agentes antimicrobianos empregados no tratamento de infecções do trato urinário.

5. Material e Métodos

5.1 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

No presente estudo foram analisados 118 isolados de UPEC obtidos de pacientes com diagnóstico clínico de infecção do trato urinário, e contagem superior a 10^5 UFC/mL na amostra de urina analisada, no período de março a maio de 2018, sendo que os isolados foram obtidos de pacientes de diferentes grupos etários e sexo (Tabela 1). Os isolados foram fornecidos pelo laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/SP. Estudo aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Botucatu (09994419.6.1002.5795).

Tabela 1. Dados dos pacientes com diagnóstico clínico de infecção do trato urinário.

Faixas etárias dos Pacientes estudados	Número de Pacientes	Sexo dos pacientes:	
		Masculino	Feminino
Crianças (0-10)	10	4	6
Adolescentes (11-17)	9	1	8
Adulto Jovem (18-40)	36	0	36
Adulto (41-65)	36	2	34
Idoso (>65)	27	5	22
Total	118	12	106

5.2 Detecção de fatores de virulência associados à patogenicidade de ExPEC

A presença de genes responsáveis por codificar vários fatores de virulência relacionados com a patogenicidade de ExPEC foi determinada pela amplificação de DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a extração do DNA, parte do cultivo bacteriano (5-10 colônias) obtido em uma placa de ágar MacConkey (Difco, USA) foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 200 μ L de água MilliQ estéril, e depois submetida à fervura por 10 minutos e centrifugada a 11.200 g por 1 minuto. Para a realização das reações de PCR foi utilizado 1 μ L do DNA molde, 7,5 μ L de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 5,0 μ L de H₂O livre de nucleases e 0,34 μ M de cada iniciador (Tabela 2).

Após a amplificação dos fragmentos, aproximadamente 5 μ L de cada reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose foi preparado por aquecimento, sendo a agarose (Agargem, Espanha) preparada em tampão TBE 1X (Tris - ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A eletroforese foi realizada em TBE 1X e uma corrente constante de 100 V. O marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega, USA) foi

utilizado para verificar o tamanho dos produtos amplificados. As bandas foram detectadas através da coloração por solução de SYBR Safe DNA gel (Invitrogen, USA) na diluição de [1:10.000] e visualizadas utilizando um transiluminador de luz ultravioleta. As imagens foram registradas por um sistema de captação de imagens Alphamager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

Os seguintes isolados de bactéria foram utilizados como controles positivos nos ensaios de PCR realizados para a investigação dos genes codificadores de virulência: *E. coli* E2348/69 (*ecpA*); *E. coli* C1845 (*sat*); *E. coli* RS218 (*fimH*, *sfaDE*, *hra*, *kpsMTII*, *traT*, *ibe10*, *ompT* e *iroN*); *E. coli* J96 (*papA*, *papC*, *vat*, *hlyA* e *cnf1*); *E. coli* EDL933 (*iha*); *E. coli* A30 (*afaBC*); *E. coli* 042 (*irp2*), *E. coli* V27 (*ireA*), *E. coli* EC40 (*hlyF*, *cva* e *sitA*), *E. coli* EC678 (*cdt*), UPEC 13 (*bmaE*, *tsh*) e *Shigella flexneri* (*iucD*).

Tabela 2. Sequências empregadas para a pesquisa de marcadores de virulência associados a patogenicidade de isolados de ExPEC.

Gene	Sequência dos <i>Primers</i> (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
Adesinas			
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	Johnson &Stell 2000
<i>papA</i>	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	720	Johnson &Stell 2000
<i>papC</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTCTGCAGGGATGCAATA	328	Le Bouguenec et al.,1992
<i>afaBC</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750	Le Bouguenec et al.,1992
<i>sfa/focDE</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	Le Bouguenec et al., 1992
<i>ecpA</i>	GCAACAGCCAAAAAAGACACC CCAGGTCGCGTCGAACT	477	Hernandes et al., 2011
<i>iha</i>	CAGGTCGGGGTTACCAAGT CAAATGGCTCTCTCCGTCATGC	925	Szalo et al., 2002
<i>hra</i>	TCACTTGACAGACCAGCGTTTC GTAACCTCACACTGCTGTACCT	537	Ewers et al., 2007
<i>bmaE</i>	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	507	Johnson and Stell, 2000
Invasina			
<i>ibe10</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGCAAACCATGC	170	Johnson &Stell 2000
Toxinas			
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	Johnson &Stell 2000
<i>cnfI</i>	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG CATTACAGAGTCTGCCCTCATTATT	498	Yamamoto et al., 1995
<i>cdt</i>	GAAARTAAATGGAAAYAYAMATGTCGG AATCWCCWRSAAATCATCCAGTTA	466	Tennant et al., 2009
<i>sat</i>	TGCTGGCTCTGGAGGAAC TTGAACATTCAGAGTACCGGG	667	Ewers et al., 2007
<i>vat</i>	AACGGTTGGTGGCAACAATCC AGCCCTGTAGAAATGGCGAGTA	420	Boisen et al., 2009
<i>usp</i>	ACATTCACGGCAAGCCTCAG AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	448	Momtaz et al., 2013
<i>picU</i>	TCAGGCCGGTAAGAACAGCAAAAT ACGGTAAGAGTGTGGATGGCGGAGTC	372	Parham et al., 2003
<i>tsh</i>	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC CTTCCGATGTTCTGAACGT	824	Ewers et al., 2004
<i>hlyF</i>	GGCGATTTAGGCATTCCGATACTC ACGGGGTCGCTAGTTAAGGAG	599	Johnson et al., 2006b
Aquisição de Ferro			
<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	Johnson et al., 2000b
<i>irp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCCGGCAGCGTTTCTTCT	264	Czeczulin et al., 1999
<i>iucD</i>	AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA CCATCCGATGTCAGTTTCTG	760	Dezfulian et al., 2003
<i>ireA</i>	ATTGCCGTGATGTGTTCTGC CACGGATCACTTCAATGCGT	384	Ewers et al., 2007
<i>sitA</i>	AGGGGGCACAACCTGATTCTCG TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	Rodriguez-Siek et al., 2005
Resistência ao soro (Protactinas)			
<i>traT</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290	Johnson &Stell 2000
<i>ompT</i>	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC CCCGGGTCATAGTGTTCATC	559	Johnson et al., 2000
<i>iss</i>	ATCACATAGGATTCTGCCG CAGCGGAGTATAGATGCCA	309	Ewers et al., 2005
<i>kpsMTH</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272	Johnson &Stell 2000
<i>cva</i>	TCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCCATGCT	597	Ewers et al., 2007

5.3 Detecção de marcadores diagnósticos para os patotipos EPEC e EAEC

A detecção dos genes considerados como marcadores diagnósticos associados aos patotipos EPEC e EAEC foram determinados através de PCR. Os seguintes isolados bacterianos foram utilizados como controle positivo: *E. coli* E2348/69 (*escN*), *E. coli* 042 (*aggR* e *aatA*).

Tabela 3. Sequências de iniciadores empregados para a pesquisa de marcadores dos patotipos EPEC e EAEC.

Gene	Sequência dos Primers (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
<i>escN</i>	CGACGACTATTGCAGAGT GCCTTATCTGCTTCAGGA	670	Hernandes <i>et al.</i> , 2013
<i>aggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254	Toma <i>et al.</i> , 2003
<i>aatA</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	Schmidt <i>et al.</i> , 1995

5.4 Detecção de fatores de virulência associados à patogenicidade de EAEC

A presença de genes responsáveis por codificar vários fatores de virulência relacionados com a patogenicidade de EAEC foi determinada pela amplificação de DNA através da reação em cadeia da polimerase, conforme descrito acima. Os seguintes isolados bacterianos foram utilizados como controle positivo das reações de PCR: *E. coli* 042 (*aafA*, *pic*, *pet*, *astA*, *aaiA* e *aap*), *E. coli* RNT785 (*agg3A*), *E. coli* BA1116 (*agg4A*), *E. coli* 17-2 (*aggA*), *E. coli* 67330 (*agg5A*) e *Shigella flexneri* (*sigA*, *sepA*).

Tabela 4. Sequências empregadas para a pesquisa de marcadores de virulência associados à patogenicidade de isolados de EAEC.

Gene	Sequência dos <i>Primers</i> (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
Adesinas			
<i>aagA</i>	GCGTTAGAAAGACCTCCAATA GCCGGATCCTTAAAAATTAATTCCGGC	432	Nataro et al., 1992
<i>aafA</i>	ACATGCATGCAAAAAATCAGAATGTTTGTT CGGGATCCATTTGTCACAAGCTCAGC	550	Elias et al., 1999
<i>agg3A</i>	GTATCATTGCGAGTCTGGTATTTCAG GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	462	Bernier et al., 2002
<i>agg4A</i>	TCCATTATGTCAGGCTGCAA GGCGTTAACGTCTGATTTCC	411	Boisen et al., 2008
<i>agg5A</i>	CATGTTTATTATCTATTAGTTTCGCC TCCACCGTACGTTCGTCATTA	215	Jønsson et al. (2015)
Toxinas			
<i>pic</i>	GGGTATTGTCCGTTCCGAT ACAACGATACCGTCTCCCG	1175	Czeczulin et al., 1999
<i>pet</i>	GTGTTTCAACCAGGTTCAACA CCTTCACCAATTTTATGCAGT	1037	Gioppo et al., 2000
<i>sigA</i>	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTGTTG	430	Boisen et al., 2009
<i>sepA</i>	GCAGTGGAAATATGATGCGGC TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	794	Restieri et al., 2007
<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	Savarino et al., 1993
Outros			
<i>aap</i>	CTTTTCTGGCATCTTGGGT GTAACAACCCCTTTGGAAGT	232	Czeczulin et al., 1999
<i>aaiA</i>	CCCACGACCAGATAACG GTTTTTCAGGATTGCCATTAG	476	Andrade et al., 2014

5.5 Classificação filogenética

A classificação dos isolados de UPEC nos diferentes grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F e *E.* clades) foi determinada através da técnica de Multiplex-PCR previamente descrita por Clermont e colaboradores [Clermont *et al.*, 2013]. Os isolados classificados como pertencentes ao filogruppo B2, portador do gene *chuA* e do fragmento TspE4.C2, ou no filogruppo F foram posteriormente testados para confirmar a classificação nos filogruppo citados, ou então, serem reclassificados no filogruppo G, recém descrito por Clermont e colaboradores [Clermont *et al.*, 2019].

5.6 Cultura de células HeLa e determinação do padrão de aderência

As células HeLa, originárias de carcinoma de colo do útero, e fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP), foram mantidas através de cultivos sucessivos em frascos apropriados para cultura de células (TPP, Suíça) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, UK) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, South America) e de 1% de mistura antibiótica (Pen Strep, Gibco

USA). Após a formação da monocamada celular na superfície do frasco, a cultura foi lavada e descolada com a adição de solução de associação tripsina-versene (ATV), seguida da agitação manual dos frascos. Após descolamento das células, a tripsina foi inativada com a adição de DMEM com 10% SFB. Após determinação do número de células utilizando a câmara de Neubauer, estas foram diluídas em meio DMEM na concentração final de 1×10^5 células/mL, e distribuídas em microplacas de 24 orifícios contendo lamínulas de vidro, em volume de 1mL por orifício. As células permaneceram em cultura a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por aproximadamente 48 horas, até atingirem o estágio de semiconfluência.

O teste de interação foi realizado segundo o descrito por Cravioto e colaboradores [Cravioto *et al.*, 1979] com modificações. As amostras bacterianas foram inoculadas, a partir de cultura em caldo LB cultivado por 18 horas a 37°C, na diluição 1:50, em microplacas de 24 orifícios, contendo células HeLa em meio DMEM acrescido de 2% de SFB e 1% de D-manose. Após 3 horas de incubação a 37°C (período de infecção), a microplaca foi lavada com PBS estéril e reincubada por mais 3 horas com meio DMEM fresco (período de multiplicação). Em seguida, foram novamente lavadas por 6 vezes com PBS estéril, e então, as preparações foram fixadas com metanol, para posterior coloração com May-Grünwald/Giemsa (Sigma-Aldrich, GER) para análise do padrão de aderência, em microscopia óptica de imersão.

5.7 Teste de identificação da polimerização de actina

O Teste de polimerização da actina (FAS – Fluorescence Actin Staining) foi realizado segundo o descrito por Knutton e colaboradores [Knutton *et al.* 1989]: ao final do ensaio de aderência, as células foram fixadas em formaldeído a 3% em PBS, permeabilizadas com 1% de Triton X-100 e incubadas, no escuro, com faloidina marcada com fluoresceína por 20 minutos. As lamínulas foram lavadas em PBS, montadas em glicerol e observadas ao microscópio de fluorescência em aumento de imersão.

5.8 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de UPEC foi realizado através da técnica da difusão da droga em ágar Mueller Hinton (OXOID, UK) a partir de discos impregnados [Bauer *et al.*, 1960]. A realização dos antibiogramas, e posterior interpretação dos halos de inibição foram feitos segundo recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

Os isolados de UPEC foram avaliados frente às seguintes drogas antimicrobianas: Ampicilina (10 µg) Ampicilina/sulbactam (10/10 µg), Amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), Piperacilina/tazobactam (100/10 µg), Cefalotina (30 µg), Cefuroxima (30 µg), Fosfomicina (200 µg), Cefepima (30 µg), Ertapenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Amicacina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Ácido nalidíxico (30 µg), Norfloxacin (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cotrimoxazol (25 µg), Nitrofurantoina (300 µg). Os discos impregnados com as drogas antimicrobianas utilizadas para a realização do antibiograma foram gentilmente cedidos por Cefar Diagnóstica Ltda., Brasil. Isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes de drogas antimicrobianas foram classificados como multirresistentes [Magiorakos *et al.*, 2012].

5.9 Produção de Beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL) e detecção dos principais determinantes genéticos associados a esse fenótipo

A detecção de ESBL foi realizada utilizando a metodologia disco combinado [CLSI, 2018], empregando-se os seguintes antimicrobianos: ceftazidima (30 µg), ceftazidima + ácido clavulânico (30 µg/10 µg), cefotaxima (30 µg) e cefotaxima + ácido clavulânico (30 µg/10 µg). Os isolados de UPEC foram considerados produtores de ESBL quando a diferença de medida de halos do antimicrobiano com clavulanato, em relação ao mesmo sem o inibidor, foi ≥ 5 mm. Os isolados que se mostrarem produtores de ESBL foram avaliados quanto à presença dos seguintes genes: *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-8}*, *bla_{CTX-M-15}*, empregando-se primers descritos na Tabela 5. Isolados previamente caracterizadas [Fernandes *et al.*, 2017] foram utilizadas como controle para o teste fenotípico e para as reações de PCR.

Tabela 5. Sequências empregadas para a detecção dos principais determinantes genéticos associados à produção de ESBL.

Gene	Sequência dos Primers (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
<i>bla_{SHV}</i>	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC TTTATGGCGTTACCTTTGACC	1051	Yagi et al., 2000
<i>bla_{TEM1}</i>	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	840	Kruger et al., 2004
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	AAATGTGCTGCTCCTTTCGTGAGC AGGGTTCGTTGCAAGACAAGACTG	1112	Garcia et al., 2008
<i>bla_{CTX-M-8}</i>	GCAAGCGCATTTTTGTTTTT GACGACTTTCTGCCTTCTGC	900	Fernandes et al., 2017
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	CACACGTGGAATTTAGGGACT GCCGTCTAAGGCGATAAACA	499	Pitout et al., 2004
<i>bla_{CMY-2}</i>	ATGATGAAAAAATCGTTATGCT TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG	1140	Cejas et al., 2012

6. Resultados

Os isolados de UPEC estudados foram predominantemente identificados no grupo filogenético B2 (39,8%, 47/118), apesar da ocorrência de isolados identificados em outros filogrupos, tais como: A (14,4%, 17/118), B1 (14,4%, 17/118), D (12,7%, 15/118), F (8,5%, 10/118), G (3,4%, 4/118), E (2,5%, 3/118), *E. clades* (2,5%, 3/118); e C (1,7%, 2/118) (Figura 1). Entre os quatro isolados reclassificados no recentemente descrito filogrupo G, dois haviam sido inicialmente identificados no filogrupos B2, e dois no filogrupo F. Embora a presença de isolados de UPEC identificados no filogrupo B2 tenha sido alta em crianças (70,0%) (Tabela 6), essa associação não se mostrou estatisticamente significativa ($P>0,05$).

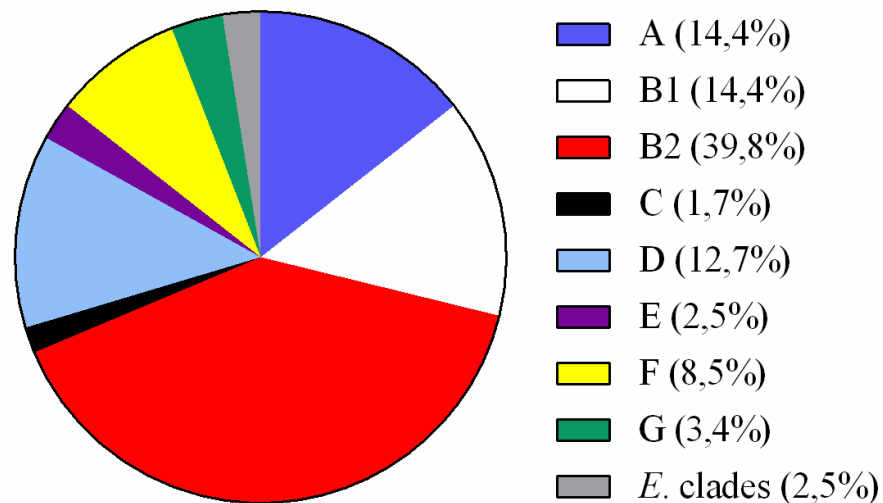


Figura 1. Classificação dos 118 isolados de UPEC estudados nos distintos grupos filogenéticos de *E. coli*. Note a alta frequência de isolados de UPEC identificado no filogrupo B2 (39,8%).

Tabela 6. Associação entre faixa etária dos pacientes e os isolados de UPEC classificados nos distintos grupos filogenéticos de *E. coli*.

Faixas Etárias	Número de Pacientes	No. (%) de isolados de UPEC identificados nos distintos grupos filogenéticos								
		A	B1	B2	C	D	E	F	G	<i>E.</i> clades
0 – 10	10	0	3 (30,0)	7 (70,0)	0	0	0	0	0	0
11 - 17	9	2 (22,2)	1 (11,1)	4 (44,4)	0	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	0
18 - 40	36	4 (11,1)	4 (11,1)	9 (25,0)	0	7 (19,4)	2 (5,6)	6 (16,7)	3 (8,3)	1 (2,8)
41 - 65	36	7 (19,4)	4 (11,1)	13 (36,1)	1 (2,8)	6 (16,7)	0	2 (5,6)	1 (2,8)	2 (5,6)
>65	27	4 (14,8)	5 (18,5)	14 (51,9)	1 (3,7)	1 (3,7)	1 (3,7)	1 (3,7)	0	0
Total	118	17 (14,4)	17 (14,4)	47 (39,8)	2 (1,7)	15 (12,7)	3 (2,5)	10 (8,5)	4 (3,4)	3 (2,5)

Entre os 29 genes codificadores de fatores de virulência relacionados à ExPEC testados, os mais frequentes entre os 118 isolados de UPEC foram: *fimH* (98,3%, 116/118), *traT* (82,2%, 97/118), *ecpA* (78,0%, 92/118), *ompT* (62,4%, 74/118), *irp2* (52,5%, 62/118), *iucD* (37,3%, 44/117), *usp* (31,4%, 37/117) e *papC* (32,2%, 38/118) (Tabela 7). Os genes *tsh* e *bmaE* não foram encontrados em nenhum dos isolados estudados. Os genes *sfa/focDE*, *cdt* e *cnf1* foram encontrados exclusivamente em isolados pertencentes ao grupo filogenético B2 (Tabela 7). Também é importante destacar que o gene *ibe10* foi detectado apenas em isolados identificados nos grupos filogenéticos B2 e F, *ireA* em isolados identificados nos filogrupos B2, D e G, enquanto o gene *vat* ocorreu apenas em isolados identificados nos filogrupos B2 e G (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição de genes codificadores de fatores de virulência em isolados de UPEC identificados nos distintos grupos filogenéticos de *E. coli*.

Genes investigados ^a	Grupos filogenéticos:									Total (n=118)
	A (n=17)	B1 (n=17)	B2 (n=47)	C (n=2)	D (n=15)	E (n=3)	F (n=10)	G (n=4)	E. clades (n=3)	
Adesinas										
<i>fimH</i>	15 (88,2)	17 (100)	47 (100,0)	2 (100,0)	15 (100,0)	3 (100,0)	10 (100,0)	4 (100,0)	3 (100,0)	116 (98,3)
<i>ecpA</i>	12 (70,6)	12 (70,6)	37 (78,7)	2 (100,0)	13 (86,7)	3 (100,0)	8 (80,0)	4 (100,0)	1 (33,3)	92 (78,0)
<i>papA</i>	1 (5,9)	1 (5,9)	11 (23,4)	0	9 (60,0)	0	5 (50,0)	1 (25,0)	1 (33,3)	29 (24,6)
<i>papC</i>	1 (5,9)	2 (11,7)	18 (38,3)	0	11 (73,3)	0	4 (40,0)	1 (25,0)	1 (33,3)	38 (32,2)
<i>sfa/focDE</i>	0	0	20 (42,6)	0	0	0	0	0	0	20 (16,9)
<i>iha</i>	2 (11,8)	1 (5,9)	13 (27,7)	0	9 (60,0)	0	3 (30,0)	1 (25,0)	0	29 (24,6)
<i>afaBC</i>	1 (5,9)	0	2 (4,3)	0	0	1 (33,3)	0	1 (25,0)	0	5 (4,2)
<i>hra</i>	0	0	0	0	2 (13,3)	0	1 (10,0)	0	0	3 (2,5)
Invasina										
<i>ibe10</i>	0	0	16 (34,0)	0	0	0	1 (10,0)	0	0	17 (14,4)
Toxinas										
<i>hlyA</i>	1 (5,9)	0	8 (17,0)	0	2 (13,3)	0	0	0	0	11 (9,3)
<i>cnfl</i>	0	0	6 (12,8)	0	0	0	0	0	0	6 (5,1)
<i>cdt</i>	0	0	2 (4,3)	0	0	0	0	0	0	2 (1,7)
<i>vat</i>	0	0	25 (53,2)	0	0	0	0	1 (25,0)	0	26 (22,0)
<i>sat</i>	1 (5,9)	1 (5,9)	11 (23,4)	0	10 (66,7)	0	5 (50,0)	1 (25,0)	0	29 (24,6)
<i>usp</i>	0	0	34 (72,3)	0	1 (6,7)	0	2 (20,0)	0	0	37 (31,4)
<i>picU</i>	1 (5,9)	0	6 (12,8)	0	1 (6,7)	0	1 (20,0)	1 (25,0)	0	10 (8,5)
<i>hlyF</i>	0	3 (17,6)	3 (6,4)	1 (50,0)	0	1 (33,3)	0	1 (25,0)	0	9 (7,6)
Sideróforos										
<i>iroN</i>	0	1 (5,9)	4 (8,5)	0	0	0	0	0	0	5 (4,2)
<i>irp2</i>	4 (23,5)	3 (17,6)	36 (76,6)	1 (50,0)	10 (66,7)	1 (33,3)	4 (40,0)	4 (100,0)	0	62 (52,5)
<i>iucD</i>	4 (23,5)	5 (29,4)	21 (44,7)	1 (50,0)	5 (33,3)	0	6 (60,0)	2 (50,0)	0	44 (37,3)
<i>ireA</i>	0	0	8 (17,0)	0	1 (6,7)	0	0	1 (25,0)	0	10 (8,5)
<i>sitA</i>	6 (35,3)	3 (17,6)	34 (72,3)	2 (100,0)	9 (60,0)	1 (33,3)	5 (50,0)	2 (50,0)	0	62 (52,5)
Protactinas										
<i>traT</i>	13 (76,5)	12 (70,6)	39 (83,0)	2 (100,0)	15 (100,0)	3 (100,0)	7 (70,0)	4 (100,0)	1 (33,3)	97 (82,2)
<i>ompT</i>	6 (35,3)	7 (41,2)	39 (83,0)	1 (50,0)	12 (80,0)	1 (33,3)	6 (60,0)	2 (50,0)	0	74 (62,4)
<i>iss</i>	2 (11,8)	1 (5,9)	5 (10,6)	2 (100,0)	0	1 (33,3)	0	0	0	11 (9,3)
<i>kpsMTH</i>	0	0	2 (4,3)	0	1 (6,7)	0	2 (20,0)	0	0	5 (4,2)
<i>cva</i>	1 (5,9)	2 (11,8)	1 (2,1)	0	0	0	0	1 (25,0)	0	5 (4,2)

^aOs genes *tsh* e *bmaE* não foram encontrados em nenhum dos isolados de UPEC estudados.

Entre os genes associados aos patotipos de DEC, foram encontrados cinco isolados positivos para os genes *aggR* e *aatA*, característicos do patotipo EAEC (Tabela 8). Além disso, um isolado foi positivo para o gene *escN* (UPEC-92), localizado na região LEE encontrada em isolados do patotipo EPEC (Tabela 8). A ausência do gene *bfpB* na UPEC-92 indica que esse isolado apresenta um genótipo compatível com isolados de aEPEC (Tabela 8).

Tabela 8. Isolados de UPEC com marcadores de DEC.

Identificação dos isolados de UPEC	Marcadores de DEC pesquisados				Características fenotípicas	
	<i>escN</i>	<i>bfpB</i>	<i>aatA</i>	<i>aggR</i>	Padrão de Adesão ^a	FAS ^b
UPEC-34	-	-	+	+	AA	NT
UPEC-66	-	-	+	+	AA	NT
UPEC-69	-	-	+	+	AA	NT
UPEC-85	-	-	+	+	AA	NT
UPEC-92	+	-	-	-	ALL	+
UPEC-100	-	-	+	+	AA	NT

^aPadrão de aderência observado em células HeLa após 6 horas de interação: Aderência Agregativa (AA), e Aderência Localizada-*like* (ALL).

^bFAS: *Fluorescence Actin Staining*. NT: isolados não submetidos ao teste de FAS.

Entre os isolados de UPEC, que albergam marcadores característicos de DEC (Tabela 8), um isolado positivo para o gene *escN* (UPEC-92), mas desprovido do operon *bfp* (*bfpB*), produziu o padrão de aderência localizada-*like*, comumente observado entre isolados de aEPEC, que é caracterizado pela formação de microcolônias frouxas na superfície das células hospedeiras infectadas. A habilidade do isolado UPEC-92 em induzir a lesão AE, foi indiretamente avaliada através do teste de FAS, mostrando assim sua habilidade em promover o acúmulo de F-actina logo abaixo do sítio de aderência íntima da bactéria com a célula epitelial infectada (Figura 2). Os cinco isolados de UPEC que albergam os marcadores frequentemente empregados no diagnóstico laboratorial de EAEC típica (*aatA*⁺/*aggR*⁺), produziram o padrão agregativo (AA), característico de isolados desse patotipo (Figura 3).

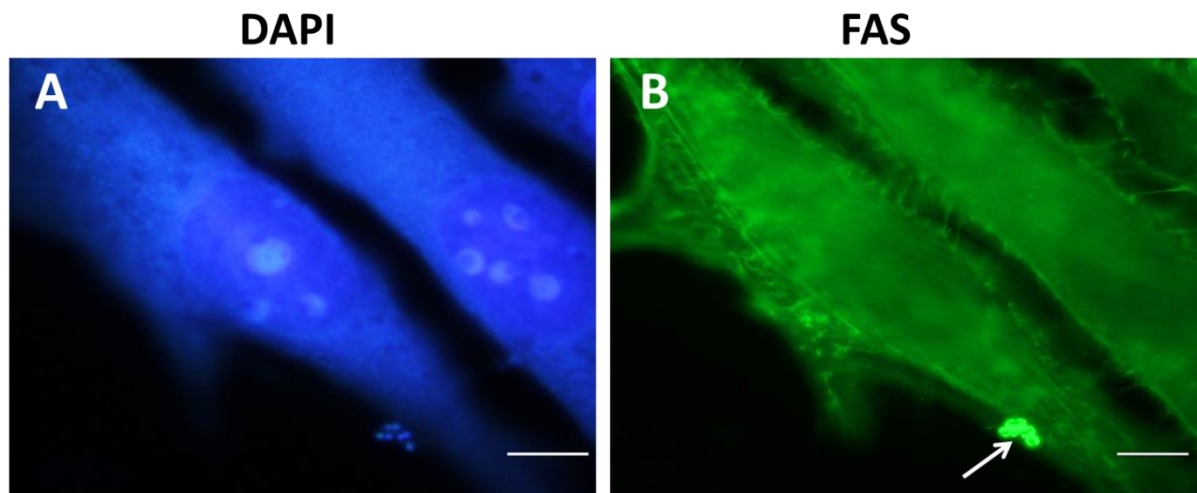


Figura 2. Teste de polimerização de F-actina (teste de FAS) realizado com o isolado de UPEC portador do gene *escN*⁺ (UPEC-92). (A) UPEC-92 aderiu as células HeLa produzindo microcolônias bacterianas frouxas características do padrão de aderência localizada-*like* (ALL). Observe em B pontos de intensa fluorescência (seta), indicando o acúmulo de F-actina no sítio de aderência íntima entre a bactéria e a célula hospedeira. Células epiteliais (HeLa) e bactérias aderidas foram coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride); e a F-actina das células hospedeiras foi marcada com Faloidina. Barra = 10 μ m.

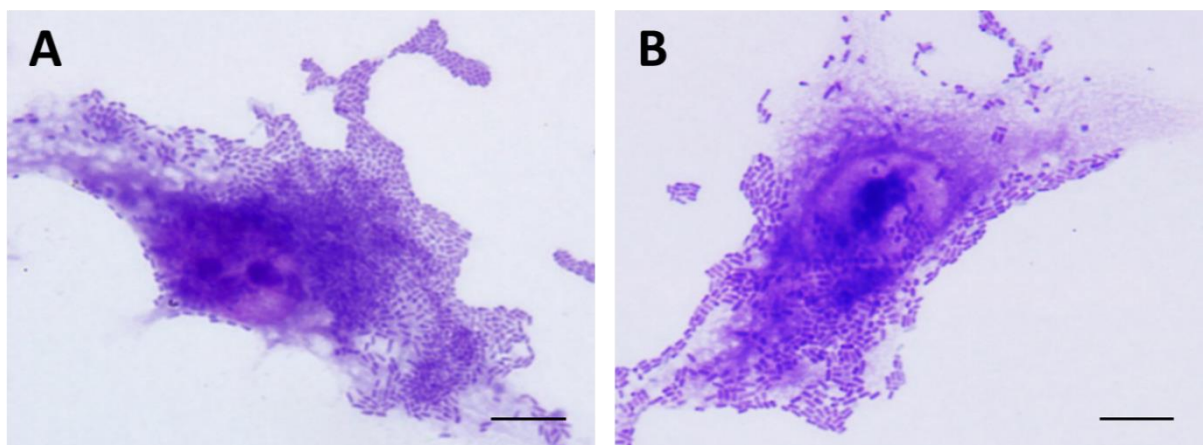


Figura 3. Padrão de aderência observado nos isolados de UPEC portadores dos genes de EAEC *aatA* e *aggR*. Imagens representativas de dois isolados de UPEC *aatA*⁺/*aggR*⁺, UPEC-66 (A) e UPEC 69 (B), produzindo o padrão agregativo (AA) em células HeLa cultivadas *in vitro*. Barra = 10 μ m.

Somente dois isolados de UPEC portadores dos marcadores *aatA* e *aggR* apresentaram genes associados a biogênese das fimbrias agregativas, sendo um isolado positivo para *agg3A* (UPEC-100) e outro para *agg4A* (UPEC-66). O gene *aap* responsável por codificar a proteína dispersina foi detectado nos cinco isolados de UPEC *aatA* e *aggR* positivos. Dois isolados de UPEC (UPEC-66 e UPEC-69) apresentaram um perfil genético idêntico para os marcadores de ExPEC investigados (*fimH*, *ecpA*, *papA*, *papC*, *iha*, *hlyA*, *sat*, *irp2*, *traT*, *ompT*, *picU*), sendo que os genes *fimH*, *ecpA*, *traT* e *ompT* foram detectados nos cinco isolados. O gene *afaBC* foi encontrado apenas no isolado UPEC-34 e o gene *iucD* apenas no isolado UPEC-100 (Tabela 9).

Tabela 9. Características dos isolados de UPEC com marcadores de EAEC e EPEC

Identificação dos isolados de UPEC <i>aatA</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁺	Filogrupo	Genes de virulência de EAEC ^a	Genes de virulência de ExPEC
UPEC-34	A	<i>astA</i> , <i>aap</i>	<i>fimH</i> , <i>ecpA</i> , <i>papA</i> , <i>papC</i> , <i>iha</i> , <i>afaBC</i> , <i>hlyA</i> , <i>sat</i> , <i>irp2</i> , <i>traT</i> , <i>ompT</i>
UPEC-66	D	<i>agg4A</i> , <i>pic</i> , <i>aap</i> , <i>aaiA</i>	<i>fimH</i> , <i>ecpA</i> , <i>papA</i> , <i>papC</i> , <i>iha</i> , <i>hlyA</i> , <i>sat</i> , <i>irp2</i> , <i>traT</i> , <i>ompT</i> , <i>picU</i>
UPEC-69	D	<i>pic</i> , <i>aap</i> , <i>aaiA</i>	<i>fimH</i> , <i>ecpA</i> , <i>papA</i> , <i>papC</i> , <i>iha</i> , <i>hlyA</i> , <i>sat</i> , <i>irp2</i> , <i>traT</i> , <i>ompT</i> , <i>picU</i>
UPEC-85	B1	<i>astA</i> , <i>aap</i>	<i>fimH</i> , <i>ecpA</i> , <i>irp2</i> , <i>traT</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>iucD</i>
UPEC-100	D	<i>agg3A</i> , <i>aap</i>	<i>fimH</i> , <i>ecpA</i> , <i>papC</i> , <i>traT</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i>

^aOs genes *aggA*, *aafA*, *agg5A*, *sigA*, *pet* e *sepA* não foram encontrados em nenhum dos isolados de UPEC *aatA*⁺/*aggR*⁺.

Genes responsáveis por codificar fatores de virulência no patotipo EAEC também foram observados em isolados de UPEC que não albergavam os genes *attA* e/ou *aggR*, tais como *pic* (1,8%), *sigA* (0,9%) e *astA* (1,8%). (Tabela10).

Tabela 10. Marcadores de virulência associados à patogenicidade de EAEC pesquisados nos isolados UPEC com os genótipos *aatA+/aggR+* e *aatA-/aggR-*.

Genótipo dos isolados de UPEC	Número de isolados	No. (%) de UPEC albergando genes de virulência de EAEC						
		Cromossomais			Plasmidiais			
		<i>pic</i>	<i>sigA</i>	<i>aaiA</i>	<i>pet</i>	<i>sepA</i>	<i>astA</i>	<i>aap</i>
UPEC <i>aatA+/aggR+</i>	5	2 (40,0)	0	2 (40,0)	0	0	2 (40,0)	5 (100,0)
UPEC <i>aatA-/aggR-</i>	113	2 (1,8)	1 (0,9)	0	0	0	2 (1,8)	0
Total	118	4 (3,4)	1 (0,8)	2 (1,7)	0	0	4 (3,4)	5 (4,2)

Entre os isolados estudados todos apresentaram susceptibilidade para os antimicrobianos: meropenem e piperaciclina/tazobactam. As maiores taxas de resistência observadas foram para os antibióticos: ampicilina (45,8%), cotrimoxazol (34,7%), ácido nalidíxico (32,2%), cefalotina (20,3%), norfloxacina (20,3%), e ciprofloxacina. Isolados de UPEC resistentes à cefotaxima (11,9%) e ceftazidima (5,9%), cefalorsporinas de terceira geração, e à cefepima (11,0%), cefalosporina de quarta geração, também foram observados (Tabela 11).

Tabela 11. Frequência de resistência dos isolados de UEPC frente à 19 drogas antimicrobianas testadas.

Drogas Antimicrobianas	Interpretação do Antibiograma ^a :			
	S	SDD	I	R
Betalactâmicos				
Ampicilina (AMP, 10µg)	63 (53,4)	-	1 (0,8)	54 (45,8)
Piperacilina + Tazobactam (PPT, 100/10µg)	116 (98,3)	-	2 (1,7)	0
Ampicilina/Sulbactam (ASB, 10/10µg)	98 (88,1)	-	11 (9,3)	9 (7,6)
Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 20/10µg)	100 (84,7)	-	9 (7,6)	9 (7,6)
Cefepima (CPM, 30µg)	103 (87,3)	3 (2,5)	-	12 (10,2)
Cefuroxima (CRX, 30µg)	103 (87,3)	-	0	15 (12,7)
Cefalotina (CFL, 30µg)	53 (44,9)	-	41 (38,1)	24 (20,3)
Ceftazidima (CAZ, 30µg)	107 (90,7)	-	4 (3,4)	7 (5,9)
Cefotaxima (CTX, 30µg)	104 (88,1)	-	0	14 (11,9)
Ertapenem (ETP, 10µg)	117 (99,2)	-	0	1 (0,8)
Meropenem (MER, 10µg)	118 (100,0)	-	0	0
Aminoglicosídeos				
Gentamicina (GEN, 10µg)	100 (84,7)	-	11 (9,3)	7 (5,9)
Amicacina (AMI, 30µg)	109 (92,4)	-	8 (6,8)	1 (0,8)
Quinolonas				
Ácido Nalidíxico (NAL, 30µg)	72 (61,0)	-	8 (6,8)	38 (32,2)
Norfloxacina (NOR, 10µg)	90 (76,3)	-	4 (3,4)	24 (20,3)
Ciprofloxacina (CIP, 5µg)	87 (73,7)	-	7 (5,9)	24 (20,3)

Inibidor da via Folato

Trimetoprim – Sulfametoxazol (SUT, 25µg)	77 (65,3)	-	0	41 (34,7)
--	-----------	---	---	--------------

Nitrofurano

Nitrofurantoina (NIT, 300µg)	114 (96,6)	-	2 (1,7)	2 (1,7)
------------------------------	------------	---	---------	---------

Derivado do ácido Fosfônico

Fosfomicina (FOS, 200µg)	111 (94,1)	-	0	7 (5,9)
--------------------------	------------	---	---	---------

^aInterpretação do antibiograma; S: sensível, SDD: sensível dose dependente, I: intermediário, R: resistente e – não há essa classificação no CLSI.

Observamos que 11,8% (14/118) dos isolados de UPEC estudados foram confirmados como produtores de ESBL. Genes responsáveis por codificar ESBL foram detectados em 78,6% (11/14) dos isolados de UPEC-ESBL+, sendo esses: *bla_{CTX-M-15}* (42,9%, 6/14), *bla_{CTX-M-8}* (21,4%, 3/14), e *bla_{CMY2}* (14,3%, 2/14). Ademais, O gene *bla_{TEM-1}* foi detectado em 42,9%, (6/14) dos isolados de UPEC-ESBL+ identificados. (Tabela 12).

Tabela 12. Características dos isolados produtores de betalactamases de espectro estendido.

Isolates de UPEC	Grupo filogenético	Perfil de Resistencia aos Betalactâmicos ^a	Genes codificadores de betalactamases
UPEC-10	<i>E</i> , clades	AMP, CFL, CRX, CTX, CPM	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-8}</i>
UPEC-17	A	CAZ, CTX	-
UPEC-20	A	AMP, CFL, CRX, CAZ, CTX, CPM	<i>bla_{CTX-M-15}</i>
UPEC-30	A	AMP, CFL, CRX, CTX, CPM	<i>bla_{CTX-M-15}</i>
UPEC-55	B1	AMP, AMC, CFL, CRX, CTX, CPM	<i>bla_{CMY-2}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i>
UPEC-60	<i>E</i> , clades	AMP, AMC, CFL, CRX, CAZ, CTX, CPM	<i>bla_{CTX-M-15}</i>
UPEC-66	D	CAZ, CTX, CPM, ETP	NT
UPEC-85	B1	AMP, ASB, AMC, CFL, CRX, CTX, CPM	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-8}</i>
UPEC-86	B2	AMP, CFL, CRX, CTX	<i>bla_{TEM-1}</i>
UPEC-94	B1	AMP, AMC, CFL, CRX, CAZ, CTX, CPM	<i>bla_{CMY-2}</i>
UPEC-109	A	AMP, CFL, CRX, CTX, CPM	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-8}</i>
UPEC-112	A	AMP, CFL, CRX, CAZ, CTX, CPM	<i>bla_{CTX-M-15}</i>

UPEC-114	B2	AMP, AMC, CFL, CRX, CAZ, CTX, CPM,	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i>
UPEC-120	A	AMP, CFL, CRX, CTX	<i>bla_{CTX-M-15}</i>

^a**Betalactâmicos testados:** **Penicilinas:** Ampicilina (AMP), Ampicilina/sulbactam (ASB), Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC); **Cefalosporinas:** Cefepima (CPM), Cefuroxima (CRX), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX) Cefalotina (CFL). **Carbapenêmico:** Ertapenem (ETP).

Entre os isolados estudados, 19 (16,1%, 19/118) apresentaram o fenótipo de multirresistência, que é definido quando um isolado bacteriano é resistente a três ou mais classes de antimicrobianos [Magiorakos *et al.*, 2012]. A maioria dos isolados de UPEC multirresistentes (73,7%, 14/19) apresentou resistência aos antimicrobianos pertencentes às classes dos betalactâmicos, das quinolonas e dos inibidores da via folato. (Tabela 13). Também pudemos observar que entre os isolados de UPEC multirresistentes, 52,6% (10/19) foram capazes de produzir ESBL.

Tabela 13. Relação dos antimicrobianos de isolados multirresistentes.

Identificação dos isolados de UPEC	ESBL	Inibidor da via Folato	Classes de drogas antimicrobianas testadas:				Derivados do ácido Fosfônico
			Betalactâmicos	Aminoglicosídeos	Quinolonas	Nitrofurano	
UPEC-10	+	SUT	AMP, CRX, CPM, CFL, CTX	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-15	-	SUT	AMP, ASB	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-18	-	SUT	AMP	GEN	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-19	-	SUT	AMP	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-20	+	SUT	AMP, CRX, CPM, CFL, CAZ, CTX	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-30	+	SUT	AMP, CRX, CPM, CFL, CTX	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-43	-	SUT	AMP, AMC, CRX, CFL	GEN	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-48	-	SUT	AMP	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-55	+	SUT	AMP, AMC, CTX, CRX, CPM, CFL	-	NAL, CIP, NOR	-	FOS
UPEC-57	-	SUT	AMP, ASB	GEN	-	-	-
UPEC-60	+	SUT	AMP, AMC, CAZ, CTX, CRX, CPM, CFL	-	NAL, CIP, NOR	NIT	-
UPEC-89	-	SUT	AMP	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-94	+	SUT	AMP, AMC, CAZ, CTX, CRX, CPM, CFL	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-101	-	SUT	AMP	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-108	-	SUT	AMP	-	-	-	FOS
UPEC-109	+	SUT	AMP, CRX, CPM, CFL, CTX	-	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-112	+	SUT	AMP, CRX, CPM, CFL, CAZ, CTX	GEN	NAL, CIP, NOR	-	-

UPEC-114	+	SUT	AMP, AMC, CRX, CPM, CFL CAZ, CTX	GEN	NAL, CIP, NOR	-	-
UPEC-120	+	SUT	AMP, CRX, CFL, CTX	-	NAL, CIP, NOR	-	-

Betalactâmicos: Penicilinas: Ampicilina (AMP), Piperacilina/tazobactam (PPT), Ampicilina/sulbactam (ASB), Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC); **Cefalosporinas:** Cefepima (CPM), Cefuroxima (CRX), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX) Cefalotina (CFL). **Inibidor da via folato:** Trimetoprim - Sulfametoxazol (SUT). **Aminoglicosídeos:** Gentamicina (GEN). **Quinolonas:** Ácido nalidíxico (NAL), Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacina (CIP). **Nitrofurano:** Nitrofurantoina (NIT). **Derivado do ácido fosfônico:** Fosfomicina (FOS).

7. Discussão

UPEC estão associadas com a morbidade e a mortalidade em pacientes com ITU sendo adquiridas na comunidade ou de origem nosocomial [Tharwat *et al.*, 2019], diante disso, há uma necessidade de caracterizar estes patógenos em relação a determinantes genéticos e a susceptibilidade aos tratamentos que podem ser administrados, para um tratamento eficaz e um melhor entendimento da patogênese e epidemiologia. Os resultados demonstram que as ITUs associadas à *E. coli* comunitária são causadas por um grupo diversificado de isolados com características distintas.

Entre os isolados de UPEC estudados foi observada a prevalência de isolados identificados como pertencentes ao grupo filogenético B2 (39,8%, 47/118) semelhante ao observado em outros estudos conduzido em diferentes regiões geográficas [Skjøt-Rasmussen *et al.*, 2013; Kot *et al.*, 2016; Munkhdelger *et al.*, 2017]. Entretanto, há estudos que relatam um cenário distinto do descrito acima, como por exemplo, um estudo realizado na Rússia demonstrou que a maioria dos isolado de UPEC estudados pertencia ao grupo filogenético A, destacando assim possíveis diferenças regionais entre os isolados de *E. coli* causadores de ITU [Grude *et al.*, 2007]. Na Espanha e nos Estados Unidos, foram relatadas porcentagens menores de isolados de UPEC classificados no grupo filogenético D em relação ao observado na nossa investigação [López-Banda *et al.*, 2014]. Isolados de UPEC pertencentes ao filogrupos A e B1, geralmente associados a *E. coli* comensais, também foram observados. Neste estudo também foram detectados isolados classificados no novo grupo filogenético, denominado grupo G, recentemente descrito por Clermont e colaboradores, que está filogeneticamente relacionado aos grupos B2 e F. Até aonde conhecemos, esse é o primeiro estudo a identificar isolados de UPEC pertencentes ao grupo filogenético G no Brasil [Clermont *et al.*, 2019].

Os genes que codificam adesinas são importantes fatores de virulência que ocorrem com mais frequência nos isolados de UPEC, pois auxiliam no estabelecimento da ITU e provavelmente na ascensão do patógeno para os rins [López-Banda *et al.*, 2014; Malekzadegan *et al.*, 2018]. Sugere-se que as fímbrias do tipo 1 e P sejam comuns entre as cepas UPEC associadas à cistite e à pielonefrite, respectivamente, de acordo com outros relatos [Paniagua-Contreras *et al.*, 2017]. O gene *fimH* que codifica a proteína apical FimH, um fator importante para a colonização, foi encontrado na grande maioria dos isolados, sendo que apenas dois isolados, pertencentes ao filogrupo A, não albergavam este gene. Por outro lado, em um estudo recente realizado no México, a prevalência de *fimH* foi relatada em 61,3%, um valor muito inferior ao observado em nossa investigação [Gao *et al.*, 2017].

Os outros genes que codificam fatores de virulência relacionados à ExPEC apresentaram uma frequência maior em isolados pertencentes ao grupo filogenético B2, sendo que alguns (*saf/focDE*, *cdt* e *cnfI*) foram encontrados exclusivamente neste grupo, indicando um possível fator que contribui para a colonização e manutenção destas bactérias no hospedeiro.

Estudos tem demonstrado que a frequência dos genes *papC* e *sfa/focDE* pode variar consideravelmente dependendo da região geográfica estudada. Estudos realizados no México relatam que os genes *papC* e *sfa/focDE* ocorreram em 70,0% e 74,0% dos isolados de UPEC estudados, respectivamente. Por outro lado, semelhante aos resultados obtidos em nossa investigação, estudos realizados no Iran e no Brasil mostraram a ocorrência desses dois genes em 25,0% e 26,0% do isolados de UPEC, respectivamente [López-Banda *et al.*, 2014; Dormanesh *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2011]. Curiosamente, em um trabalho realizado na Coreia do Sul observou o gene *sfa/focDE* em 100% dos isolados estudados [Lee *et al.*, 2016]. Em concordância com outros estudos, que caracterizaram a ocorrência de genes de virulência em isolados de UPEC, o gene *afaBC* foi encontrado em menos de 5% dos isolados estudados [Dormanesh *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2011; Rahdar *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2013].

A toxina HlyA está envolvida em danos nos tecidos e comprometimento da resposta imune local [Tarchouna *et al.*, 2013]. De acordo com a maioria dos estudos já realizados, a prevalência dos genes *hlyA* e *cnfI* é relativamente alta, sendo esses dois genes detectados em até 50,0% dos isolados de UPEC em um estudo realizado no Irã [Momtaz *et al.*, 2013]. Controversamente, nos isolados deste estudo, a prevalência desses genes foi de 9,3% e 5,1%, respectivamente. A proteína específica uropatogênica (*usp*) pode atuar como uma bacteriocina, aumentando assim a capacidade de isolados de UPEC em infectar o trato urinário (Tiba *et al.*, 2008). Muito embora esse gene já tenha sido reportado em alta frequência (85,0%) em estudos anteriores [Tabasi *et al.*, 2016], no presente estudo, esse gene foi detectado em 31,4% dos isolados estudados.

A maioria dos genes associados à virulência ExPEC e DEC está localizada em elementos móveis, como plasmídeos, bacteriófagos e ilhas de patogenicidade [Toval *et al.*, 2013]. A combinação de marcadores típicos da virulência ExPEC e DEC nos isolados caracterizados neste estudo corrobora a ideia de que *E. coli* exibe uma grande plasticidade genômica e que a transferência gênica pode resultar em isolados híbridos com características de DEC e ExPEC, podendo ocorrer transferência horizontal destes genes. Alguns estudos sugerem que os fatores de virulência de ExPEC podem ter sido selecionados pela seleção

natural como um produto do comensalismo, porque alguns destes genes associados à virulência também são necessários para a bactéria persistir no intestino [Abe et al., 2008; Toval *et al.*, 2013; Lindstedt *et al* 2018]. Um estudo realizado no Brasil demonstrou que o gene *eae*, característico do patotipo EPEC, bem como os genes *aggR* e *aap*, que são marcadores de virulência do patotipo EAEC, poderiam ocorrer entre isolados de UPEC. Ademais, também foi demonstrado, nesse mesmo estudo, que alguns dos isolados de UPEC carregando marcadores de EAEC eram capazes de produzir o padrão AA em células epiteliais cultivada in vitro [Abe et al., 2008].

Em consonância com o descrito acima, um estudo posterior relatou que 3,5% dos isolados de *E. coli*, obtidos de infecções ocorridas em sítios extra intestinais, albergavam marcadores genéticos característicos de EAEC e ExPEC [Lara *et al.*, 2017], indicando assim a circulação de patógenos híbridos UPEC/EAEC no cenário epidemiológico Brasileiro. No presente estudo também foram identificados isolados de UPEC, pertencentes a distintos grupos filogenéticos, carregando marcadores de EPEC e EAEC, evidenciando assim, a heterogeneidade genética da espécie *E. coli*. Os isolados deste estudo que foram caracterizados como UPEC/EAEC (*aggR*⁺/*aatA*⁺) e UPEC/aEPEC (*escN*⁺/*bfpB*) apresentaram o padrão de aderência agregativo e localizado-*like*, respectivamente. Além disso, também foi possível verificar indiretamente a capacidade do isolado UPEC/aEPEC em induzir a lesão de *attaching and effacing*, indicando que este isolado de UPEC (UPEC-92) apresenta não somente características genotípicas, mas também fenotípicas condizente com isolados de *E. coli* de origem fecal classificados como aEPEC. No entanto, o potencial dos isolados híbridos UPEC/EAEC e UPEC/aEPEC em causar diarreia ainda é necessita ser avaliado.

Alguns isolados albergam genes codificadores de fatores de virulência relacionados a EAEC como *sigA*, *pic* e *astA*, mas são desprovidos dos genes *aggR* e *aatA*. O fato de *pic* e *sigA* serem genes localizados no cromossomo de EAEC talvez possa sugerir que alguns desses isolados tenham perdido o plasmídeo de virulência de EAEC (pAA) durante sua passagem pelo hospedeiro, ou nos sub-cultivos realizados no laboratório.

Outro fator importante que influencia o prognóstico das ITU causadas por UPEC são as taxas de resistências a diferentes classes de antimicrobianos, especialmente quando as ITU são causadas por bactérias multirresistentes, representado assim, um grande desafio para o seu tratamento [Magiorakos *et al.*, 2012]. Os principais antimicrobianos prescritos para o tratamento de ITU incluem betalactâmicos, sulfonamidas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos

[Issakhanian *et al.*, 2019]. No Brasil, temos poucos dados recentes sobre a resistência antimicrobiana entre isolados de UPEC. No nosso estudo, os isolados apresentaram maior taxa de resistência para os antimicrobianos do grupo dos betalactâmicos, sendo que para ampicilina e cefalotina, foram observadas taxas de resistência de 45,8% e 20,3%, respectivamente. Também pudemos observar uma alta frequência de resistência entre os isolados de UPEC para as sulfonamidas (34,7%), o que corrobora dados obtidos em estudos anteriores [Kot *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018].

O aumento do número de isolados resistentes a antimicrobianos, particularmente para cefalosporinas de terceira geração e quinolonas, criou desafios na terapia das ITUs [Issakhanian *et al.*, 2019]. É importante salientar que no nosso estudo a maioria dos isolados que apresentaram resistência a quinolonas (20,3%) foram classificados como multirresistentes. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo realizado em Brasília no qual foi detectado resistência a ciprofloxacina em 18,8% dos isolados de UPEC e 73,0% destes isolados também foram classificados como multirresistentes [Moreira da Silva *et al.*, 2017]. Entre os isolados que apresentaram resistência a betalactâmicos foram encontrados 11,8% classificados como produtores de ESBL, o que pode configurar um problema no tratamento empírico das ITUs uma vez que esses isolados são resistentes a vários grupos de betalactâmicos.

A resistência a cefalosporinas de terceira e quarta geração é mediada pela produção de ESBLs, principalmente pelas enzimas SHV, TEM e CTX-M [Rupp *et al.*, 2003]. No presente estudo, o gene *bla_{CTX-M}* foi o tipo ESBL mais comumente encontrado nos isolados de UPEC analisados. O gene *bla_{CTX-M-15}* é o gene responsável por codificar a enzima β -lactamase encontrada mais frequentemente em ambientes hospitalares, bem como na comunidade, além de ser associado a infecções graves ocorridas em recém nascidos [Shakiba *et al.*, 2019]. Nesse estudo, o gene *bla_{CTX-M-15}*, foi encontrado em 42,8% dos isolados de UPEC que apresentaram o fenótipo de ESBL, sendo esses isolados obtidos tanto de pacientes adultos, como de idosos. No Brasil, estudos realizados com *E. coli*, obtidos de infecções da corrente sanguínea, relataram que mais de 50,0% dos isolados eram produtores de CTX-M-15 [Seki *et al.*, 2013; Daga *et al.*, 2019]. Ademais, no nosso estudo observamos que 21,4% dos isolados produtores de ESBL albergavam o gene *bla_{CTX-M-8}*. A ocorrência do gene *bla_{CTX-M-8}* também tem sido observada no Brasil em estudos, caracterizando isolados de ExPEC, realizados tanto no Rio de Janeiro, como no Paraná. No entanto, nos estudos previamente referidos o gene *bla_{CTX-M-8}* tem sido observado em uma frequência inferior a 15,0% [Peirano *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2015].

O gene *bla_{CMY-2}* presente no plasmídeo *pAmpC* é considerado amplamente distribuído geograficamente [Pitout *et al.*, 2007; Hanson *et al.*, 2008; woodford *et al.*, 2007]. Genes associados ao *pAmpC* geralmente estão localizados em plasmídeos de alto peso molecular, os quais estão geralmente relacionados à resistência a múltiplas drogas [Jacoby *et al.*, 2005]. Nesse estudo dois isolados de UPEC, produtores de ESBL, albergam o gene *bla_{CMY-2}* e foram classificados como multirresistentes (UPEC-55 e UPEC-94), servindo de alerta para o tratamento de infecções causadas por isolados carregando o *pAmpC*, já que podem haver poucas opções terapêuticas, aumentando assim a morbimortalidade nos pacientes afetados.

Apesar das taxas de resistência observadas para as drogas antimicrobianas das classes dos betalactâmicos, quinolonas e inibidores da via folato; da ocorrência do fenótipo de multirresistência associados a isolados de UPEC capazes de produzir ESBL, drogas antimicrobianas como a nitrofurantoina e a fosfomicina continuam sendo boas indicações terapêuticas para o tratamento empírico das ITUs, uma vez que baixas taxas de resistência foram observadas para esses antimicrobianos. É importante destacar que mesmo isolados classificados como multirresistentes, mostraram-se sensíveis a esses antimicrobianos.

8. Conclusão

Nossos dados mostraram que os isolados de UPEC albergam uma grande variedade de fatores de virulência, e foram classificados em vários grupos filogenéticos de *E. coli*. O predomínio de UPEC identificado no filogrupo B2, associado à observação do vasto número de genes responsáveis por codificar fatores de virulência presentes nesses isolados, talvez explique o sucesso de UPEC do filogrupo B2 na colonização e sobrevivência nas células epiteliais do sistema urinário do hospedeiro.

Ademais, alguns isolados foram portadores de marcadores de DEC, o que sugere que infecções assintomáticas do trato gastrointestinal por DEC possa constituir uma importante fonte para as ITUs. Além disso, o aumento do número de isolados de UPEC resistentes a alguns dos antimicrobianos testados pode servir como um alerta para os profissionais da área da saúde a fim de selecionar de forma mais adequada o tratamento das ITUs.

9. Referências

1. Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A. M., Blanco, J., Blanco, J. E., et al. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 397–406. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x
2. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991 May 15;276 (Pt 1):269-70.
3. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003 Jul 4;301(5629):105-7.
4. Andrade, F. B., Gomes, T. A., & Elias, W. P. (2014). A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*, 106, 16-18.
5. Ang, C. W., Bouts, A. H., Rossen, J. W., Van der Kuip, M., Van Heerde, M., and Bökenkamp, A. (2016). Diarrhea, urosepsis and hemolytic uremic syndrome caused by the same heteropathogenic *Escherichia coli* strain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35, 1045–1047. doi: 10.1097/INF.0000000000001226
6. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Extended-Spectrum b-Lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolates from Urinary Tract Infections in Southern Brazil
7. Aurass, P., Prager, R., and Flieger, A. (2011). EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environ. Microbiol.* 13, 3139–3148. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02604.x
8. Bäckhed F, Alsén B, Roche N, Angström J, von Euler A, Breimer ME, Westerlund-Wikström B, Teneberg S, Richter-Dahlfors A. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem.* 2002 May 17;277(20):18198-205. Epub 2002 Mar 4
9. Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496.
10. Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011 62: 1-10
11. Bernier, C., Gounon, P., & Le Bouguéneq, C. (2002). Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infection and immunity*, 70(8), 4302-4311.
12. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Aug 1;72(8):2145-2155. doi: 10.1093/jac/dkx146.
13. Boehm DF, Welch RA, Snyder IS. Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect Immun.* 1990 Jun;58(6):1959-64.

14. Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP (2008) New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun* 76(7):3281-92.
15. Boisen, N., Ruiz-Perez, F., Scheutz, F., Krogfelt, K. A., & Nataro, J. P. (2009). High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(2), 294-301.
16. Boquet P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*. 2001 Nov;39(11):1673-80.
17. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1211-33.
18. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013;5:58-65.
19. Clermont, O., Dixit, O. V., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., ... & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental microbiology*, 21(8), 3107-3117.
20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 28th Informational Supplement. CLSI Document M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018:2018.
21. Cyويا PS, Rodrigues GR, Nishio EK, Medeiros LP, Koga VL, Pereira AP, Vespero EC, Houle S, Dozois CM, Nakazato G, Kobayashi RK. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Oct 29;9(10):1068-75.
22. Czczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999;67:2692-9.
23. da Silva, Rafaella Christina Rocha Moreira, et al. "Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasilia, Brazil." *Journal of global antimicrobial resistance* 9 (2017): 61-67.
24. Daga, Ana Paula, et al. "Escherichia coli bloodstream infection in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 9 (2019): 191.
25. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965 Oct 16;208(5007):239-41
26. Dezfulian H, Batisson I, Fairbrother JM, Lau PC, Nassar A, Szatmari G, et al. Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. *J Clin Microbiol* 2003;41:1375-85.
27. Dhillon RH, Clark J. ESBLs: A Clear and Present Danger? *Crit Care Res Pract*. 2012;2012:625170. doi: 10.1155/2012/625170. Epub 2011 Jun 6
28. Dormanesh, B., Dehkordi, F. S., Hosseini, S., Momtaz, H., Mirnejad, R., Hoseini, M. J., ... & Darian, E. K. (2014). Virulence factors and o-serogroups profiles of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Iranian pediatric patients. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(2).

29. ELIAS, W. P., SUZART, S., TRABULSI, L. R., NATARO, J. P., & GOMES, T. A. (1999). Distribution of aggA and aafA gene sequences among Escherichia coli isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative E. coli. *Journal of medical microbiology*, 48(6), 597-599.
30. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol* 2004;104:91-101.
31. Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian diseases*, 49(2), 269-273.
32. Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antáo, E. M., ... & Böhnke, U. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(3), 163-176.
33. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect*. 2009 Dec;73(4):345-54. doi: 10.1016/j.jhin.2009.02.021. Epub 2009 Jul 10
34. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., and Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 269–284. doi: 10.1038/nrmicro3432
35. Foxman B, Zhang L, Palin K, Tallman P, Marrs CF. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J Infect Dis*. 1995 Jun;171(6):1514-21
36. Foxman B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol*. 2010 Dec;7(12):653-60. doi: 10.1038/nrurol.2010.190.
37. Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 28, 1–13. doi: 10.1016/j.idc.2013.09.003
38. Gao, Q., Zhang, D., Ye, Z., Zhu, X., Yang, W., Dong, L., ... & Liu, X. (2017). Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotypes. *Microbial pathogenesis*, 104, 217-224.
39. Gioppo, N. M., Elias Jr, W. P., Vidotto, M. C., Linhares, R. E., Saridakis, H. O., Gomes, T. A., ... & Pelayo, J. S. (2000). Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. *FEMS microbiology letters*, 190(2), 293-298.
40. Grude N, Potaturkina-Nesterova NI, Jenkins A, Strand L, Nowrouzian FL, Nyhus J, Kristiansen BE (2007) A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infection. *Clin Microbiol Infect* 13: 208-211.
41. Hagan, E. C., Lloyd, A. L., Rasko, D. A., Faerber, G. J., & Mobley, H. L. (2010). *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001187.
42. Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Hänner M, Taschner N, Burkhard P, Aebi U, Müller SA. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol*. 2002 Nov 8;323(5):845-57

43. Hanson, Nancy D., et al. "Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 β -lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a US community." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52.10 (2008): 3814-3816.
44. Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3677-82. Epub 2003 Mar 24
45. Heimer SR, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL. Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):593-7.
46. Hernandez RT, Velsko I, Sampaio SC, Elias WP, Robins-Browne RM, Gomes TA, et al. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:8391-9.
47. Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2001 Mar 15;32 Suppl 1:S9-S15.
48. Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International journal of antimicrobial agents*, 25(5), 358-373.
49. Huang B, Wang Q, Deng C, Wang J, Yang T, Huang S, Su XZ, Liu Y, Pan L, Li G, Li D, Zhang H, Bacar A, Abdallah KS, Attoumane R, Mliva AM, Zheng S, Xu Q, Lu F, Guan Y, Song J. Prevalence of crt and mdr-1 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Grande Comore island after withdrawal of chloroquine. *Malar J*. 2016 Aug 15;15(1):414. doi: 10.1186/s12936-016-1474-4.
50. Issakhanian, L., & Behzadi, P. (2019). Antimicrobial Agents and Urinary Tract Infections. *Current pharmaceutical design*.
51. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirliff ME.(2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jan;21(1):26-59. doi: 10.1128/CMR.00019-07.
52. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Sep;35(9):1697-704.
53. Johnson JR, O'Bryan TT, Low DA, Ling G, Delavari P, Fasching C, et al. Evidence of Commonality between Canine and Human Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains That Express papG Allele III. *Infect Immun* 2000a;68: 3327–3336.
54. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC Jr, et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN* (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun* 2000b;68:3040-7.
55. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". *J Lab Clin Med*. 2002 Mar;139(3):155-62
56. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000;181:261-72.

57. Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J., & Nolan, L. K. (2006). DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of bacteriology*, 188(2), 745-758.
58. Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN, Hultgren SJ. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 14;92(6):2081-5.
59. Jønsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu RV, Santiago AE, Jenssen H, Nataro JP, Krogfelt KA (2015) Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 83(4):1396-405.
60. Jønsson, R., Struve, C., Boisen, N., Mateiu, R. V., Santiago, A. E., Jenssen, H., ... & Krogfelt, K. A. (2015). Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 83(4), 1396-1405.
61. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol* 2004; 2:123-40.
62. Kaper JB, O'Brien AD. Overview and Historical Perspectives. *MicrobiolSpectr*. 2014 Dec;2(6).
63. Kim, D. H., Subhadra, B., Kang, H. Y., Woo, K., Kim, J., Son, Y. J., ... & Choi, C. H. (2018). Virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection in Korea. *Genes & genomics*, 40(6), 625-634.
64. Kline KA, Schwartz DJ, Lewis WG, Hultgren SJ, Lewis AL.(2011). Immune activation and suppression by group B streptococcus in a murine model of urinary tract infection. *Infect Immun*. 2011 Sep;79(9):3588-95. doi: 10.1128/IAI.00122-11. Epub 2011 Jun 20.
65. Koga VL, Tomazetto G, Cyويا PS, Neves MS, Vidotto MC, Nakazato G, Kobayashi RKT. (2014) Molecular Screening of Virulence Genes in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human Blood Culture in Brazil. *Biomed Res Int*. 2014;2014:465054.
66. Kot, B., Wicha, J., Gruzewska, A., Piechota, M., Wolska, K., & Obrebska, M. (2016). Virulence factors, biofilm-forming ability, and antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients. *Turkish journal of medical sciences*, 46(6), 1908-1914.
67. Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun*. 1990 Jun;58(6):1995-8.
68. Kuehn MJ, Heuser J, Normark S, Hultgren SJ. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips *Nature*. 1992 Mar 19;356(6366):252-5.
69. Lane MC, Lockatell V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, Johnson DE, Mobley HL Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun*. 2005 Nov;73(11):7644-56
70. Lara FB, Nery DR., De Oliveira PM., Araujo ML., Carvalho FR., Messias-Silva LC, et al.. Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections.2017 *Front. Microbiol*. 8:146.
71. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1189-93.

72. Lee, J. H., Subhadra, B., Son, Y. J., Kim, D. H., Park, H. S., Kim, J. M., ... & Choi, C. H. (2016). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Letters in applied microbiology*, 62(1), 84-90.
73. Lemonnier M, Landraud L, Lemichez E. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 Sep;31(5):515-34. Epub 2007 Aug 3.
74. Levison ME, Kaye D. (2013). Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Curr Infect Dis Rep.* 2013 Apr;15(2):109-15. doi: 10.1007/s11908-013-0315-7.
75. Lindstedt, Bjørn-Arne, et al. "High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples." *BMC infectious diseases* 18.1 (2018): 544.
76. López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández ÁH, ArroyoEscalante S, Moncada-Barrón D, Villanueva-Recillas S, Xicohtencatl-Cortes J, Hernández-Castro R (2014) Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int* 2014: 959206.
77. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
78. Malekzadegan, Y., Khashei, R., Ebrahim-Saraie, H. S., & Jahanabadi, Z. (2018). Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients. *BMC infectious diseases*, 18(1), 572.
79. Martinez, Juan J., et al. "Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells." *The EMBO journal* 19.12 (2000): 2803-2812.
80. Moch T, Hoschützky H, Hacker J, Kröncke KD, Jann K. Isolation and characterization of the alpha-sialyl-beta-2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(10):3462-6
81. Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Dehkordi, F. S., Ranjbar, R., Sarshar, M., & Souod, N. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 12(1), 8.
82. Moreno E, Planells I, Prats G, Planes AM, Moreno G, Andreu A. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 53, no. 2, pp. 93–99, 2005
83. Morschhäuser J, Uhlin BE, Hacker J. Transcriptional analysis and regulation of the *sfa* determinant coding for S fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol Gen Genet.* 1993 Apr;238(1-2):97-105.
84. Munkhdelger, Y., Gunregjav, N., Dorjpurev, A., Juniichiro, N., & Sarantuya, J. (2017). Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(01), 51-57.

85. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM (1992) Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 60(6):2297-304.
86. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6:829-831.
87. Nielubowicz GR, Mobley HL.(2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol*. 2010 Aug;7(8):430-41. doi: 10.1038/nrurol.2010.101. Epub 2010 Jul 20.
88. Nogueira, Keite da Silva, et al. "Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48.2 (2015): 162-169.
89. Nuutinen, M., and Uhari, M. (2001). Recurrence and follow-up after urinary tract infection under the age of 1 year. *Pediatr. Nephrol.* 16, 69–72. doi: 10.1007/s004670000493
90. Olesen, B., Scheutz, F., Andersen, R. L., Menard, M., Boisen, N., Johnston, B., et al. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the Cause of an outbreak of urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3703–3711. doi: 10.1128/JCM.01909-12
91. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician*. 2002 Feb 1;65(3):455-64.
92. Oliveira, F. A., Paludo, K. S., Arend, L. N., Farah, S. M., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., ... & Fadel-Picheth, C. M. (2011). Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genet Mol Res*, 10(4), 4114-25.
93. Paiva AL, Lincopan N, Silva KC, Neves PR, Moreno AM, McCulloch JA, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJ Low-virulence phylogenetic background of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *J Infect Dev Ctries* 2013 7: 756-760. doi:10.3855/jidc.3781
94. Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Rodríguez-Moctezuma, J. R., Domínguez-Trejo, P., Vaca-Paniagua, F., & Vaca, S. (2017). Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(4), 478-485.
95. Parham NJ, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Jan 15;230(1):73-83.
96. Parham, N., Spencer, J., Taylor, D., Ternent, H., Innocent, G., Mellor, D., ... & Williams, A. (2003). An adapted immunomagnetic cell separation method for use in quantification of *Escherichia coli* O157: H7 from bovine faeces. *Journal of microbiological methods*, 53(1), 1-9.
97. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Oct;18(4):657-86.
98. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*. 2006 Jun;34(5 Suppl 1):S20-8; discussion S64-73.
99. Pitout, Johann DD, et al. "Population-based laboratory surveillance for AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary." *Emerging infectious diseases* 13.3 (2007): 443.

100. Poirel L, Mammeri H, Nordmann P TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type beta-lactamase from *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Dec;48(12):4528-31.
101. Prager, R., Lang, C., Aurass, P., Fruth, A., Tietze, E., and Flieger, A. (2014). Two novel EHEC/EAEC hybrid strains isolated from human infections. *PLoS ONE* 9:e95379. doi: 10.1371/journal.pone.0095379
102. Qin, X., Hu, F., Wu, S., Ye, X., Zhu, D., Zhang, Y., & Wang, M. (2013). Comparison of adhesin genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains. *PLoS One*, 8(4), e61169.
103. Rahdar, M., Rashki, A., Miri, H. R., & Ghalehnoo, M. R. (2015). Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(8).
104. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, Henderson IR, Sperandio V, Ravel J. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol*. 2008 Oct;190(20):6881-93
105. Restieri, C., Garriss, G., Locas, M. C., & Dozois, C. M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(5), 1553-1562.
106. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* 2005;36:241-56.
107. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*. 2003;63(4):353-65.
108. Santos AC, Zidko AC, Pignatari AC, Silva RM. Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2013;46:968-73.
109. Savarino, S. J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B. M., Levine, M. M., Guandalini, S., & Guerry, P. (1993). Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 3093-3097.
110. Schmoll T, Hoschützky H, Morschhäuser J, Lottspeich F, Jann K, Hacker J. Analysis of genes coding for the sialic acid-binding adhesin and two other minor fimbrial subunits of the S-fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1989 Dec;3(12):1735-44.
111. Sharma PC, Jain A, Jain S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm*. 2009 Nov-Dec;66(6):587-604.
112. Skjøl-Rasmussen, L., Olsen, S. S., Jakobsen, L., Ejrnaes, K., Scheutz, F., Lundgren, B., ... & Hammerum, A. M. (2013). *Escherichia coli* clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. *Clinical microbiology and infection*, 19(7), 656-661.
113. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell CV, Johnson DE, Donnenberg MS, Welch RA, Mobley HL. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6373-81
114. Stamm WE (2002). Scientific and clinical challenges in the management of urinary tract infections. *Am J Med*. 2002 Jul 8;113 Suppl 1A:1S-4S.

115. Stamm WE and Hooton TM (1993). Management of urinary tract infections in adults. *N Engl J Med.* 1993 Oct 28;329(18):1328-34
116. Stamm WE, Hooton TM, Johnson JR, Johnson C, Stapleton A, Roberts PL, Moseley SL, Finn SD. (1989). Urinary Tract Infections: From Pathogenesis to Treatment. *The Journal Of Infectious Diseases.* VOL. 159, NO. 3 . March.
117. Svanborg Eden C, Andersson B, Aniansson G, Leffler H, Lomberg H, Mestecky J, Wold AE. Glycoconjugate receptors for bacteria attaching to mucosal sites: examples for *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*. *Adv Exp Med Biol.* 1987;216B:931-9.
118. Szalo IM, Goffaux F, Pirson V, Piérard D, Ball H, Mainil J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res Microbiol* 2002;153:653-8.
119. Tabasi M, Karam MR, Habibi M, Mostafavi E, Bouzari S. (2016) Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Cystitis, Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. *J ClinDiagn Res.* 2016 Dec;10(12):DC01-DC07.
120. Talukdar PK, Rahman M, Rahman M, Nabi A, Islam Z, Hoque MM, Endtz HP, Islam MA. Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. *PLoS One.* 2013;8(4):e61090.
121. Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W., & Boukadida, J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(6), e450-e453.
122. Tennant, S. M., Tauschek, M., Azzopardi, K., Bigham, A., Bennett-Wood, V., Hartland, E. L., ... & Robins-Browne, R. M. (2009). Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC microbiology*, 9(1), 117.
123. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. (2017) UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol.* 2017 Aug 15;8:1566.
124. Tharwat, N., El-Sherif, R., Elnagdy, S., Marzaban, R., & Amer, S. (2019). Virulent *Escherichia coli* strains among Egyptian patients with acute diarrhoea versus urinary tract infection, and their antibiotic susceptibility. *Arab Journal of Gastroenterology.*
125. Tiba, Monique Ribeiro, Tomomasa Yano, and Domingos da Silva Leite. "Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50.5 (2008): 255-260.
126. Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. EPM-modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofanodesaminase. *RevMicrobiol*1982a;13:309-15.
127. Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. MILi-um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *RevMicrobiol*1982b;13:230-5.
128. Tolg, C., and Bagli, D. J. (2012). Uropathogenic *Escherichia coli* infection: potential importance of epigenetics. *Epigenomics*4, 229–235. doi: 10.2217/epi.12.5

129. Toval F., Köhler CD., Vogel U., Wagenlehner F, Mellmann A., Fruth A, et al. (2014). Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 52, 407–418.
130. Trifillis AL, Donnenberg MS, Cui X, Russell RG, Utsalo SJ, Mobley HL, Warren JW. Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. *Kidney Int.* 1994 Oct;46(4):1083-91.
131. Welch RA, Burland V, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Donnenberg MS, Blattner FR. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 24;99(26):17020-4. Epub 2002 Dec 5.
132. Woodford, Neil, et al. "Wide geographic spread of diverse acquired AmpC β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59.1 (2007): 102-105.
133. Wu XR, Sun TT, Medina JJ. In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9630-5.
134. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995;12:85-90.