

UNIVERSIDADE CEUMA UNICEUMA
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
MESTRADO EM BIOLOGIA MICROBIANA

CARLOS DRIELSON DA SILVA PEREIRA

Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e detecção molecular de genes de serinoproteases em *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário

SÃO LUÍS – MA

2021

CARLOS DRIELSON DA SILVA PEREIRA

Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e detecção molecular de genes de serinoproteases em *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana pela Universidade CEUMA.

Orientador: Dr. Afonso Gomes Abreu Junior

SÃO LUÍS – MA

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Defesa da dissertação de mestrado de Carlos Drielson da Silva Pereira, intitulada: Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e detecção molecular de genes de serinoproteases em *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, orientado pelo(a) Professor Dr. Afonso Gomes Abreu, apresentado à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade CEUMA, no dia 30 de abril de 2021.

Os membros da Banca Examinadora consideraram o(a) candidato(a)

Banca Examinadora:

Dra. Amanda Silva dos Santos Aliança
Universidade CEUMA (Memória da Qualificação)

Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda
Universidade CEUMA

Dr. Priscila Soares Sabbadini
Universidade CEUMA (Membro externo)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Yeshua, a minha esposa Érima Jôyssielly Mendonça C. Pereira que foi meu maior incentivo e ao meu orientador Afonso Gomes Abreu que muito acrescentou na minha carreira. Dedico este trabalho também aos meus pais, aos meus irmãos e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda graça sobre minha vida, por ter me dado esta oportunidade, saúde e capacidade para chegar até aqui.

Em segundo Lugar agradeço a grande pesquisadora e linda esposa Érima, por ter me incentivado a me graduar, a iniciar na pesquisa científica e por me encorajar a fazer o mestrado.

Sou muito grato a minha família, ao meu irmão Wesley Pablo, as minhas irmãs Drielle e Sirley e aos meus pais Antônio e Elizete. Eles conhecem a minha história e sabem que não foi fácil chegar até aqui. Sou grato também a meus sogros por sempre se importarem muito com os meus estudos. Tudo isso se tornou possível com a ajuda o apoio de vocês

Agradeço a todos os professores que contribuíram com minha formação.

Principalmente a professora Rita Miranda, que foi minha orientadora na graduação, você me apresentou o universo da pesquisa e me deu a primeira oportunidade.

Agradeço também a seu Hélio, Marinaldo e dona Lúcia, funcionários da universidade CEUMA, eles são pessoas que facilitam nosso trabalho.

Gratidão aos IC Marcos por toda ajuda e dedicação. Muito obrigado a Athirson, Beatriz e Fabrícia pelas colaborações, sou grato também por Mayana que me ensinou toda parte prática da PCR, sou grato também Me. Itaynara e a minha parceira de mestrado Lorena Araújo que por muitas vezes me ajudou e colaborou com meu trabalho.

Agradeço a universidade CEUMA pela oportunidade e a FAPEMA pelo apoio financeiro

E pra finalizar com chave de ouro, agradeço ao meu orientador professor Dr. Afonso Abreu, por ter me escolhido para eu ser seu orientando. Quero que saiba que você acrescentou muitas coisas boas durante esses dois anos, ensinamentos que eu vou levar para vida profissional e pessoal também. Você é um grande exemplo de pesquisador sério e ético.

RESUMO

A infecção do trato urinário (ITU) pode ser causada por diversas bactérias, porém, destacam-se as bactérias Gram-negativas, sendo mais comuns as espécies da família Enterobacteriaceae, a exemplo da *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC). O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de virulência associado a genes de serinoproteases em UPEC isoladas de pacientes com ITU, bem como analisar a suscetibilidade aos antimicrobianos utilizados na clínica. Para isso foram coletadas amostras de urina de pacientes com ITU em diversas cidades do Maranhão. Em seguida foi realizada uma análise do perfil etário dos pacientes, bem como o isolamento dos microrganismos causadores de ITU, teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, detecção de genes de serinoproteases e genes associados com a formação de biofilme. Por fim, análise da formação de biofilme em algumas amostras e o teste de toxicidade em modelo alternativo. Ao todo foram selecionadas 368 amostras de *E. coli*, das quais 89,7% eram oriundas de pacientes do gênero feminino e 10,3% do gênero masculino. O perfil de resistência mostrou que 71% das amostras foram resistentes a ampicilina e 50% a sulfametoxazol. Após PCR para os genes *ehaABDJ*, *espP*, *espC*, *tibA* e *pic*, foram selecionadas as amostras que positivaram para os genes *ehaABD*, que são associados à produção de biofilme. As duas amostras clínicas selecionadas, ITU11 e ITU71, foram capazes de produzir biofilme e ambas foram capazes de matar 100% das larvas de *Tenebrio molitor* em 24 horas. Desta forma, o estudo aponta para a necessidade de se traçar um perfil de resistência para propiciar um melhor direcionamento para o tratamento da ITU. Além disso, este foi o primeiro trabalho a descrever os genes *ehaABD* em amostras de UPEC. Esses genes podem ser determinantes para a formação de biofilme, contribuindo com o processo infeccioso, visto que uma das funções do biofilme é a proteção das bactérias contra ação de antibióticos.

Palavras Chave: *Escherichia coli*; Infecção do trato urinário; serinoproteases; biofilme.

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI) can be caused by several bacteria, however, Gram-negative bacteria stand out, with species of the Enterobacteriaceae family being more common, such as uropathogenic *Escherichia coli*. The objective of this work was to evaluate the virulence profile associated with SPATEs genes in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC isolated) from patients with ITU, as well as to analyze the susceptibility to antimicrobials used in the clinic. For this purpose, urine samples were collected from patients with UTI in several cities in Maranhão. Then, an analysis of the age profile of the patients was carried out, as well as the isolation of the microorganisms that cause UTI, susceptibility testing to antimicrobials, detection of serinoprotease genes and biofilm-forming genes, finally, analysis of the biofilm formation in some samples and the toxicity test in an alternative model. In all, 368 strains of *E. coli* were selected, of which 89.7% were from female patients and 10.3% were male. The resistance profile showed that 71% of the samples were resistant to ampicillin and 50% to sulfamethoxazole. After PCR for the *ehaABDJ*, *espP*, *espC*, *tibA* and *pic* genes, samples that were positive for the *ehaABD* genes, which are associated with biofilm production, were selected. Two isolated were selected, ITU11 and ITU71, and both were able to produce biofilm, as well as to kill 100% of the larvae of *Tenebrio molitor* in 24 hours. Thus, it is concluded that there is a need to draw a resistance profile in order to have a better direction for the treatment of UTI. In addition, this was the first work to describe the *ehaABD* genes in UPEC. These genes can be determinant for the formation of biofilm, contributing to the infectious process, since one of the biofilm's functions is the protection of bacteria against the action of antibiotics.

Keywords: *Escherichia coli*; Urinary tract infection; serinoproteases; biofilm.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

µL - Microlitro

pb - Pares de bases

°C – Grau Celsius

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CNS: Conselho Nacional de Saúde

EAEC: *Escherichia coli* Enteroagregativa

EHEC: *Escherichia coli* Enterohemorrágica

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPEC: *Escherichia coli* Enteropatogênica

ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigênica

ITU: Infecção do trato urinário

ITU11: Amostra 11 isolada de Infecção do trato urinário

ITU71: Amostra 71 isolada de Infecção do trato urinário

Kb: Quilobase

LB: Luria Bertani

MALDI-TOF: *Matriz-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*

nm: nanômetros

OD: Densidade Óptica

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

SPATE: *Serino Protease Autotransporter of Enterobacteriaceae*

TSA: Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica

UFC: Unidades formadoras de colônia

TBE: Tris Borato EDTA

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Mapa dos locais dos pontos de coleta.....	30
Figura 2: Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das amostras isoladas dos pacientes com ITU atendidos nos hospitais do Maranhão, no período de setembro a novembro de 2019.....	31
Figura 3: Formação de biofilme entre os isolados.....	32
Figura 4: Avaliação do teste de toxicidade em larva de <i>Tenebrio molitor</i>	33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Sequência dos iniciadores, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR para os marcadores de virulência de genes autotransportadores.....34
- Tabela 2:** Perfil etário dos pacientes com ITU atendidos nos hospitais do Maranhão, no período de setembro a novembro de 2019.....35
- Tabela 3:** Detecção dos genes *espP*, *espC*, *tibA*, *pic*, *ehaA*, *ehaB*, *ehaD* e *ehaJ* nas amostras de ITU.....36

Sumário

Introdução	13
Material e Métodos.....	15
Aspectos éticos.....	15
Coleta das amostras	15
Identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	15
Extração de DNA.....	15
Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	15
Eletroforese em gel de agarose	16
Ensaio de formação de Biofilme	16
Avaliação da Toxicidade em modelo alternativo	17
Análise Estatística.....	17
Resultados	17
Discussão.....	19
Conclusão	23
Referência	24
Figuras e legendas	30

FOLHA DE APRESENTAÇÃO

CAPÍTULO 1: Artigo a ser submetido na Revista Microorganism (Fator de Impacto: 4.152; Qualis: A1). Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e detecção molecular de genes de serinoproteases em *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário.

Introdução

A infecção do trato urinário (ITU) é caracterizada pela invasão e multiplicação de microrganismos nas vias urinárias. Pode ser classificada de acordo com diferentes aspectos clínicos, dentre eles, o tipo de infecção, a presença ou ausência de sintomas, se apresenta fatores complicadores, podendo ser uma infecção aguda ou crônica (TANDOGDU; WAGENLEHNER, 2016).

A ITU pode ser causada por diversas bactérias, porém, destacam-se as bactérias Gram-negativas, sendo mais comuns as espécies da família Enterobacteriaceae, a exemplo da *Escherichia coli*, responsável pelo maior número de casos de ITU na comunidade e por metade das ITU adquirida no hospital (LEE et al., 2016; SINGH; SEEMA; GUPTA, 2016; PILLONETTO et al., 2020; BELETE; SARAVANAN, 2020).

Apesar da *E. coli* ser uma bactéria que faz parte da microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente, existem grupos que podem causar patologia ao homem. As *E. coli* patogênicas são consideradas reservatórios de genes que podem ser transferidos tanto para outras *E. coli* como para bactérias de outras espécies, facilitando assim a disseminação de bactérias com genes resistência (POIREL, 2018).

As cepas de *E. coli* apresentam alta plasticidade genética, o que permite a aquisição de atributos genéticos por transferência horizontal de genes (BRAZ; MELCHIOR; MOREIRA, 2020). Estima-se que esse patógeno seja responsável por 150 milhões de casos de cistite e 2 milhões de óbitos devido à diarreia infantil e infecções extra-intestinais, a exemplo das ITUs (DE MUINCK, 2013).

E. coli pode ser classificada em dois grandes grupos: os patótipos relacionados às manifestações clínicas entéricas ou diarreiogênicas, denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e os patótipos associados às infecções extra-intestinais (ExPEC).

Dentro do grupo das ExPEC existem linhagens distintas: as cepas causadoras de meningite em neonatos (NMEC), sepsis e as que causam ITUs, denominadas de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) (SANTOS, 2018; TAPADER; BASU; PAL, 2019). UPEC é o patótipo mais comumente isolado em pacientes

com quadros clínicos de ITU, sendo responsável pela maioria dos casos (ULETT et al., 2013).

As UPEC apresentam alto grau de virulência com capacidade de produzir diversos fatores que facilitam a infecção urinária como a fímbria tipo 1, fímbria P, adesinas, hemolisinas, flagelos, polissacarídeos capsulares, fator 1 necrosante citotóxico, sistemas de transporte de ferro, lipopolissacarídeo e proteínas transportadoras (OBAID, 2014).

Dentre esses fatores de virulência, a expressão de fatores de adesão é o mais importante determinante da patogenicidade, já que a adesão de UPEC a células do trato urinário evita a depuração provocada pelo fluxo de urina. Outro mecanismo que contribui para a virulência é o desencadeamento de vias de sinalização das células do hospedeiro, podendo proporcionar o aumento da adesão bacteriana e a invasão das células hospedeiras (LARA et al., 2017).

A capacidade de formar biofilme também é um fator importante na colonização do trato urinário, pois essa camada protetora favorece o microrganismo, fazendo com que a infecção persista por mais tempo e a resistência a antibióticos seja maior, dificultando a penetração do medicamento (JAVED; MIRANI; PIRZADA; 2021). Além disso, o biofilme permite que a UPEC colonize com maior facilidade o trato urinário, fazendo com que a mesma resista a expulsão do trato urinário (NIELSEN et al., 2018).

Além dos fatores de virulência já citados, as bactérias Gram-negativas podem produzir serinoproteases, conhecidas como SPATEs (*serino proteases autotransporter of Enterobacteriaceae*) (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Essas proteases são extracelulares codificada por alguns genes que promovem efeitos citotóxicos e citopáticos sobre o hospedeiro (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014; ABREU et al., 2015; ABREU et al., 2016).

Com isso, levanta-se a hipótese de que *E. coli* uropatogênicas produtoras de SPATEs podem ser altamente virulentas, fazendo com que o tratamento seja mais demorado. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de virulência associado a genes de SPATEs em UPEC isoladas de pacientes com infecção

urinária, bem como analisar a susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos utilizados na clínica.

Material e Métodos

Aspectos éticos

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

Coleta das amostras

As amostras de urina, provenientes de pacientes com diagnóstico de infecção urinária, foram obtidas por conveniência em um laboratório de análises clínicas que recebe amostras de diversas cidades do estado.

Identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Foram utilizados os meios de cultura convencionais para semeadura dos espécimes clínicos, tais como, ágar sangue, ágar MacConkey e Caldo Tioglicolato, dentre outros. A identificação dos microrganismos foi realizada por espectrometria de massa pelo sistema automatizado MALDI-TOF (Bruker Daltonics) modelo autoflex. Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi empregado o método automatizado Vitek 2 (BiomérieuxL`etoile, França).

Extração de DNA

O DNA bacteriano foi obtido pelo método de fervura. Para isto, uma colônia selecionada a partir de um cultivo prévio em ágar foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 500 µL de água destilada e submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo por 5 minutos (ABREU et al., 2013).

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para detectar a presença de oito genes que codificam proteínas autotransportadoras e utilizou como base as metodologias descritas por Abreu e colaboradores (2013).

Para cada PCR foram utilizados: 1,0 µL de cada um dos iniciadores específicos (*forward* e *reverse*), 0,3 µL de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,0 µL de MgCl₂, 2,5 µL de tampão de PCR 1X (Invitrogen), 2,5 µL de dNTPs (Invitrogen), 1 µL de DNA e água MilliQ estéril para um volume final de 25 µL. Os primers, ciclos de amplificação e os tamanhos dos amplicons para cada um dos genes pesquisados estão descritos na Tabela 1.

Eletroforese em gel de agarose

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

Ensaio de formação de Biofilme

A formação do biofilme das amostras foi avaliada em placas de 96 poços de poliestireno, seguindo o método descrito por CULLER (2015) com modificações. Inicialmente, foi realizado o cultivo dos microrganismos em meio caldo LB com incubação de 18 horas. Em seguida foi feita a diluição da amostra em uma proporção de 1×10^8 UFC e 200 µL da diluição foram colocados em placas de 96 poços, seguido de incubação por 24 horas a 37°C. Logo após foram feitas 3 lavagens com PBS para remoção do meio de cultura. Em seguida o biofilme foi fixado com 200 µL de metanol a 75% por 15 minutos e corado com cristal violeta a 0,5% por 5 minutos. Após fixação, novas lavagens (3x) com PBS, seguido da adição de 200 µL de etanol a 95% por 2 minutos. Foi transferido 150 µL de cada poço para uma nova placa para ser realizado a leitura da absorbância no leitor de ELIZA a 550 nm. Onde as amostras com $DO \leq 0,1$ foi considerado negativo e $DO > 0,1$ foi considerado positivo

Avaliação da Toxicidade em modelo alternativo

Com o objetivo de avaliar a toxicidade das amostras foi empregado o modelo alternativo com larvas de *Tenebrio molitor*, seguindo metodologia usada por Silva (2020) com modificações. A partir de uma relação teste-controle, foram utilizadas dez larvas para cada amostra clínica de *E. coli*. Placas de Petri foram previamente identificadas para separar cada grupo de dez larvas. Os microrganismos foram incubados a 37°C por 18h em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e lavado três vezes com PBS, após isso as bactérias foram suspensas numa concentração de 1×10^8 UFC e em seguida inoculada 10 uL da suspensão no terceiro anel em cada larva. O PBS foi utilizado como grupo controle. As larvas foram observadas num período de dez dias.

Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos uma vez. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) utilizando o software Graph Pad Prism, versão 7. Para avaliação da sobrevida, utilizou-se a curva de Kaplan-Meier e o teste de Log-Rank. Para análise foi admitido o intervalo de confiança de 95% ($p < 0.05$).

Resultados

Na primeira etapa deste trabalho foram coletadas 9.961 amostras de urina de pacientes com ITU em 30 cidades do Maranhão, no período de setembro a novembro de 2019. Destas, 2.292 (23%) foram positivas para algum tipo de microrganismo. Das amostras positivas, 980 (42,75%) foram causadas por *E. coli*, das quais 368 foram selecionadas de forma aleatória para a realização deste estudo. As amostras foram oriundas de São Luís, Pinheiro, Barreirinhas, Presidente Vargas, Coroatá, Peritoró, Alto Alegre do Maranhão, Presidente Dutra e Imperatriz (Figura 1).

Ao analisar o perfil etário foi possível observar que das 368 amostras selecionadas, 330 (89,7%) foram de pacientes do gênero feminino e apenas 38 (10,3%) do gênero masculino.

Os pacientes com faixa etária entre 21 a 59 anos tiveram o maior número de amostras (n=238 / 64,7%), seguido dos idosos com 60 anos ou mais (n=58 / 15,8%) e pacientes com idade entre 0 a 12 anos (38 / 10,3%). Em menor número, os pacientes com a faixa etária de 13 a 20 anos (n=34 / 9,2%) (Tabela 2).

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado com várias categorias de antibióticos, onde foi possível observar altas taxas de resistência a alguns fármacos. Várias amostras apresentaram resistência a ampicilina (71%), sulfametoxazol (50%). Para os demais antibióticos a resistência foi menor: norfloxacina (26%), levofloxacina (23%), ciprofloxacina (22%), cefuroxime e cefazolina (19%), cefepime, ceftazidime e ceftriaxone (14%), amoxicilina (9%), ceftioxima e gentamicina (8%), nitrofurantoína (6%), piperaciclina (3%), imipenem (1%), ertapenem (1%) e meropenem (0,5%) (Figura 2).

Em seguida foi realizada a PCR para detecção de diversos genes que codificam proteínas autotransportadoras. Entre os 368 isolados, 165 (44,83%) positivaram para o gene *ehaD*, 39 (10,59%) para *ehaB*, 34 (9,23%) para o gene *pic* e 31 (8,42%) para o gene *ehaA*. Entretanto nenhum foi positivo para os genes *espP*, *espC*, *tibA* e *ehaj* (Tabela 3).

Com exceção do gene *pic*, a maioria dos genes encontrados do estudo estão relacionados com a formação de biofilme. Desta forma, foram selecionados os isolados positivos para pelo menos três genes relacionados com esse mecanismo de virulência. Assim, os isolados *ehaABD+* foram utilizados para realização de ensaio de formação do biofilme, a fim de verificar uma possível relação destes genes com a virulência dos isolados em modelo de *Tenebrio molitor*. De todas as amostras, apenas duas foram positivas para os três genes: ITU11 e ITU71.

No teste de formação de biofilme foi possível observar que a amostra *E. coli* EAEC 042 (controle) teve uma densidade óptica maior que 0,4, ao passo que a amostra *E. coli* HB101 (controle negativo) teve densidade óptica menor que 0,1. A amostra ITU11 teve um resultado pouco acima de 0,1 e a amostra ITU71 apresentou uma densidade óptica acima de 0,2 diferindo significativamente do controle negativo (Figura 3).

Com o teste de toxicidade em modelo alternativo, foi possível analisar a curva de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* frente as amostras clínicas ITU11 e ITU71. As duas amostras clínicas foram capazes de matar as dez larvas em até 24 h, diferindo significativamente do valor controle negativo HB101 que matou apenas duas larvas durante os dez dias. A amostra positiva EAEC 042, matou todas as larvas em até 72 h, enquanto o grupo controle com PBS não matou nenhuma larva (Figura 4)

Discussão

Neste estudo foi possível avaliar o perfil de pacientes com ITU atendidos em hospitais do Maranhão, localizado na região nordeste do Brasil, bem como a caracterização fenotípica e molecular dos isolados de *E. coli*, principalmente com relação à resistência aos antimicrobianos e quanto à presença de genes de SPATEs, a exemplo daqueles associados com a formação de biofilme.

Os resultados obtidos no trabalho foram semelhantes aos de uma pesquisa realizada no Irã, onde os autores relataram que de um total de 1.016 amostras de infecção do trato urinário causada por *E. coli*, 922 (89,81%) foram isoladas de pacientes do gênero feminino e apenas 94 (10,19%) de pacientes do gênero masculino (GHARAVI et al 2021).

Outro trabalho, embora com um número menor de amostras (n=60), mostrou um valor um pouco diferente, onde 18 (30%) das amostras eram de pacientes do gênero masculino e 42 (70%) das amostras de pacientes do gênero feminino, porém o número de infecção por *E. coli* nas mulheres permaneceu superior (RAEISPOUR; RANJBAR, 2018).

De acordo com os resultados obtidos nesse e em outros trabalhos, os valores apontam que pessoas do gênero feminino tem maior incidência para ITU se comparado com o gênero masculino (YADAV; PRAKASH, 2017; SHAKYA et al., 2017; GHARAVI et al., 2021). Essa proporção se deve ao fato de a estrutura fisiológica feminina ser mais suscetível a ITU, visto que a uretra é menor e mais larga e fica mais próxima da região do reto, local colonizado por *E. coli*, facilitando, assim, a infecção (DADI et al., 2020).

Apesar de não terem sido encontrados trabalhos que tenham utilizado a divisão da faixa etária igual ao da nossa pesquisa, foram encontrados alguns trabalhos com resultados bem próximos aos obtidos aqui (GHARAVI et al 2021; FATIMA et al.,2018). Neste estudo, a faixa etária com maior incidência de ITU foi de pacientes com idade entre 21 a 59 anos. Segundo uma pesquisa realizada por Dadi e colaboradores (2020), foi associado que pacientes com 25 a 45 anos apresentavam maior índice de ITU por serem mais ativos sexualmente, visto que a relação sexual pode ser favorável a infecção. Diferente do resultado obtido neste trabalho, outro estudo com 208 amostras, mostrou que pacientes idosos do gênero feminino apresentaram 50% das amostras de ITU, o autor associou a alta taxa de infecção a uma imunidade mais fragilizada, alteração no pH e deficiência do nível de estrogênio à adesão bacteriana (TEWAWONG et al., 2020).

A resistência bacteriana é outro fator que tem sido relatada como um grave problema de saúde em todoo mundo. Sendo assim, é importante que cada região realize pesquisas para conhecer o perfil de resistência dos microrganismos e entender quais antibióticos tem mais eficiência contra os microrganismos da região.

O presente trabalho mostrou que 71% das amostras de *E. coli* foram resistentes a ampicilina, valor relativamente próximo ao da pesquisa realizada por Gharavi e colaboradores (2021), onde os autores mostraram que 80,9% de suas amostras foram resistentes ao antimicrobiano. Os autores também apresentaram valores de resistência paraimipenem (0,8%) e nitrofurantoína (7,2%) semelhantes ao que encontramos neste estudo. Entretanto, nesse mesmo trabalho, a resistência para piperaciclina foi de 83%, diferente do resultado obtido em nossa pesquisa. Comparando com os valores, esses resultados mostram que microrganismos de mesma espécie, mas de regiões diferentes, podem apresentar diferentes perfis de resistência.

Shakya et al. (2017) também trouxeram alguns resultados diferentes dos obtidos em nosso estudo. Em seu trabalho, a resistência das amostras frente à amoxicilina foi de 73,69%; a nitrofurantoína,13,69%; ciprofloxacina, 38,08%; e ceftazidime, 41,6%.

Segundo Raeispour e colaboradores (2018), algumas cepas de UPEC

continuam sensíveis a imipenem e outros antibióticos, porém ele ressalta que a resistência dessa espécie está acelerada. Segundo sua pesquisa, as amostras de *E. coli* utilizadas eram resistentes a fármacos como cefepima.

O sulfametoxazol é um dos medicamentos usados de primeira escolha no tratamento de ITU, porém, de acordo com os resultados obtidos, é possível observar alta taxa de resistência dos isolados nessa pesquisa que chegou a 50%, apontando que esse fármaco não é mais tão eficiente no tratamento da ITU.

Na Europa Central, Hrbacek e colaboradores (2020), desenvolveram um estudo com dados de amostras de ITU de 2011 a 2019 e constataram que a taxa de resistência de UPEC a sulfametoxazol aumentou 30% apenas durante esse período.

Outro trabalho desenvolvido no México mostrou que de 983 *E. coli* isolados de pacientes com ITU, 64,7% das amostras também foram resistentes a sulfametoxazol (DIAZ; RIOS; CUELLAR 2019), resultados semelhantes ao deste trabalho. E corroborando com esses e outros estudos, é possível observar que o tratamento empírico de ITU não pode mais ser usado a sulfametoxazol como um medicamento de primeira escolha, visto que grande porcentagem das amostras está apresentando resistência a esse medicamento.

Após análise da sensibilidade dos isolados às diversas drogas utilizadas na clínica, foi iniciado a busca por genes que codificam para SPATEs. Estas serinoproteases estão associadas com a gravidade de diversas doenças causadas por bactérias Gram-negativas, uma vez que são responsáveis por mecanismos de adesão, colonização, evasão a componentes do sistema imune, dentre outros. Dos oito genes pesquisados neste trabalho, apenas os genes *pic* foi descrito em amostras de UPEC.

O gene *pic* foi originalmente descrito em amostras de EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa) e *Shigella flexneri* (HENDERSON et al., 1999). Assim como em nosso trabalho, uma pesquisa realizada na Índia também identificou algumas amostras de *E. coli* de ITU positivas para o gene *pic* (MODGIL et al., 2020). Vale ressaltar que este gene é comum em amostras de UPEC (MODGIL et al., 2020; NAVARO-GARCIA et al., 2010; BOLL et al., 2013).

Apesar de não ter sido encontradas amostras com o gene *tibA*, esse gene já foi encontrado em amostras de EPEC (*E. coli* enteropatogênica) (ABREU et al., 2013) e ETEC (*E. coli* enterotoxigênica) (SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005).

Os genes *espP* e *espC* até então nunca foram descritos em amostras de *E. coli* de ITU. O gene *espP* foi originalmente descrito em amostras de STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga) (BRUNDER; SCHMIDT; KARCH, 1997). Assim como em amostras de EPEC (ABREU et al., 2013) e EAEC (ANDRADE et al., 2017).

O gene *espC*, foi originalmente descrito em EPEC (STEIN et al., 1996), entretanto, estudos epidemiológicos têm mostrado a frequência desse gene em amostras de EPEC em diversas regiões do Brasil (ABREU et al., 2013; HERNANDES et al., 2020). Recentemente, Freire et al. (2020), relataram a presença de *espC* em amostras de ExPEC isoladas de bacteremia.

Apesar de não termos encontrado nenhuma amostra positiva para o gene *ehaJ*, várias amostras positivaram para os genes *ehaA*, *ehaB* e *ehaD*. Importante ressaltar que até o momento esse é o primeiro trabalho que descreve a presença desses genes em amostras de UPEC. Embora este grupo de genes tenha sido descrito originalmente em amostras de EHEC (WELLS et al., 2008), outros trabalhos já relataram amostras de EPEC (ABREU et al., 2013; EASTON et al., 2011). Portanto, uma vez que os genes *ehaABD* estão associados à formação de biofilme (EASTON et al., 2011; ABREU et al., 2013), resolvemos investigar a formação de biofilme em duas amostras que foram positivas para os três genes.

Os resultados da produção de biofilme mostraram que ambas as amostras de ITU selecionadas (ITU11 e ITU71) foram capazes de produzir biofilme, um fator que pode ser determinante para o estabelecimento da infecção.

Uma pesquisa realizada na Argentina com *E. coli* isoladas de pacientes com ITU, mostrou que de dez amostras utilizadas, três foram capazes de formar biofilme. Entretanto, apesar de apenas 30% ter sido capaz de criar biofilme, esse resultado foi relevante (VAZQUEZ et al., 2020), visto que a formação do biofilme é um fator de virulência que pode facilitar na cronicidade da infecção e retardar a eficácia do tratamento, pois pode gerar maior resistência na infecção do trato urinário (VAZQUEZ et al., 2020; BEHZAD; URBAN; GAJDACS 2020). Outro

trabalho realizado na Uganda com amostras isoladas de ITU em crianças, também identificou amostras de *E. coli* capazes de formar biofilme, que foram classificados como fraco produtor, moderado produtor e forte produtor (KATONGOLE et al, 2020).

Além da proteção e resistência a drogas, um fator importante em bactérias que produzem biofilme em ITU é a capacidade de troca de informações genética entre as cepas de *E. coli* (JAVED; MIRANI; PIRZADA; 2021).

A etapa seguinte deste estudo foi avaliar a virulência dos isolados ITU11 e ITU71 *in vivo*. O modelo de infecção utilizando larvas de *T. molitor* tem sido bastante empregado devido à vantagem de não utilização de animais, redução de custo e resultados confiáveis. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as duas amostras clínicas foram capazes de matar todas as larvas em 24 horas.

Trabalhos utilizando inoculo bacteriano para avaliar a sobrevivência de larvas de *T. molitor* ainda são escassos na literatura, porém alguns autores utilizam *T. molitor* adulto para avaliar efeitos tóxicos de substâncias, e atividades antimicrobiana (VAN DER VALK; MEIJDEN, 2014; MOREY et al., 2016; SILVA, 2020).

Uma pesquisa realizada por Haine e colaboradores (2008) mostrou que a atividade antimicrobiana na hemolinfa de *T. molitor* chegou a altos níveis durante as primeiras 48 h após a infecção, isso leva a acreditar que as amostras clínicas usadas em nossa pesquisa são altamente virulentas por ter matado as larvas num curto período de tempo. Porém, vale ressaltar que o trabalho realizado por Haine e colaboradores (2008) foi realizado com *T. molitor* na fase adulta, e nosso trabalho na fase larval.

Conclusão

De maneira geral, este trabalho mostrou a importância de se conhecer o perfil de resistência de *E. coli* isoladas de amostras de urina em uma determinada região para que os dados possam servir de parâmetros para um melhor direcionamento do tratamento. Além disso, é importante salientar que este foi o

primeiro trabalho a descrever os genes *ehaABD* em amostras de UPEC. Esses genes foram encontrados em boa parte das amostras de ITU, e isso pode facilitar a formação de biofilme e colaborar com o processo infeccioso, visto que uma das funções do biofilme é a proteção das bactérias contra ação de antibióticos.

Referência

ABREU, A. G. et al. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**. v. 7, n.2, pág.115-125, 2016.

ABREU, A. G. et al. Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 1, p. 411-414, 2013.

ABREU J. A. G. **Caracterização da proteína Pic (proteininvolved in colonization) em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015

ANDRADE, F. B. et al. Distribution of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae in typical and atypical enteroaggregative *Escherichiacoli*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 50, p. 83-86, 2017.

BEHZADI, P; URBÁN, E; GAJDÁCS, M. Association between biofilm-production and antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): an in vitro study. **Diseases**, v. 8, n. 2, p. 17, 2020.

KATONGOLE, P. et al. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2020.

JAVED, S; MIRANI, Z. A; PIRZADA, Z. A. Phylogenetic Group B2 Expressed Significant Biofilm Formation among Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli*. **Libyan Journal of Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1845444, 2021.

BELETE, M. A; SARAVANAN, M. A systematic review on drug resistant urinary tract infection among pregnant women in developing countries in Africa and Asia; 2005–2016. **Infection and drug resistance**, v. 13, p. 1465, 2020.

BOLL, Erik J. et al. Role of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors in Uropathogenesis. **Infect and Immunity**, v. 81, n.4, pág.1164-1171, 2013.

BRAZ, V. S; MELCHIOR, K; MOREIRA, C. G. *Escherichia coli* as a multi faceted pathogenic and versatile bacterium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

BRUNDER, W;SCHMIDT, H;KARCH, H.EspP, uma nova serina protease extracelular de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157: H7 cliva o fator de coagulação humano V. **Microbiologia molecular**, v. 24, n.4, pág.767-778, 1997.

Culler, H. F. et al. **Envolvimento dos genes qseC e SdiA na formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. Tese - doutorado em genética e biologia molecular. Unicamp. 2015.

DADI, B. R. et al. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. **BMC infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 108, 2020.

DE MUINCK, E. J. Deep characterization of *Escherichia coli* in a cohort of mothers and their infants. **Faculty of Mathematics and Natural Sciences**, University of Oslo.2013.

DÍAZ, E. S; RÍOS, C. J. H; CUELLAR, A. B. Antibiotic resistance: Microbiological profile of urinary tract infections in Mexico. **Surgery and surgeons** , v. 87, n. 2 P. 176-182, 2019.

EASTON, D. M. et al. Characterization of *EhaJ*, a new autotransporter protein from enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 120, 2011.

FATIMA, S. et al. Incidence of multidrug resistance and extended-spectrum beta-lactamase expression in community-acquired urinary tract infection among different age groups of patients. **Indian journal of pharmacology**, v. 50, n. 2, p. 69, 2018.

FREIRE, C. A. et al. Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) are largely distributed among *Escherichia coli* isolated from the bloodstream. **Braz J Microbiol**, p. 1-8, 2020.

GHARAVI, M. J. et al. Estudo abrangente do padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos e prevalência de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em bactérias isoladas de amostras de urina. **Relatórios científicos**, v. 11, n.1, pág.1-11, 2021.

GOOGLE EARTH-MAPAS. <http://mapas.google.com>. Consulta realizada em 01/03/2021.

HAINÉ, E. R. et al. Padrões temporais em respostas imunológicas a uma variedade de agressões microbianas (*Tenebrio molitor*). **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n.6, p.1090-1097, 2008. HENDERSON, I. R. et al. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 11, p. 5587-5596, 1999.

HERNANDES, R. T. et al. Comparative genomic analysis provides insight into the phylogeny and virulence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008373, 2020.

HRBACEK, J; CERMAK, P; ZACHOVAL, R. Current antibiotic resistance trends of uropathogens in Central Europe: Survey from a Tertiary hospital urology department 2011–2019. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 630, 2020.

AVED, S; MIRANI, Z. A; PIRZADA, Z. A. Phylogenetic Group B2 Expressed Significant Biofilm Formation among Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli*. **Libyan Journal of Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1845444, 2021.

LARA, F. et al. Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 146, 2017.

LEE, J. H. et al. 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**, v. 62, n. 1, p. 84-90, 2016.

MELLIES, Jay L. et al. espC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. **Infection and immunity**, v. 69, n. 1, p. 315-324, 2001.

MODGIL, V. et al. Molecular, phylogenetic and antibiotic resistance analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* uropathogenic *Escherichia coli* hybrid genotypes causing urinary tract infections. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 421, 2020.

MOREY, A. et al. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2016.

NAVARRO-GARCIA, F. et al. Pic, uma proteína autotransportadora secretada por diferentes patógenos da família Enterobacteriaceae, é um potente secretagogo de muco. **Infeção e imunidade**, v. 78, n.10, p.4101-4109, 2010

NIELSEN D. W. et al. The impact of media, phylogenetic classification, and *E. coli* pathotypes on biofilm formation in extraintestinal and commensal *E. coli* from humans and animals. **Frontiers in microbiology**. 2018 May 8;9:902.

PILLONETTO, M et al. The Experience of Implementing a National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Brazil. **Frontiers in public health**, v. 8, 2020.

POIREL, Laurent et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals**, p. 289-316, 2018.

OBAID J. M. S. Uropathogenic *E. coli* isolates with different virulence genes content exhibit similar pathologic influence on vero cells. **Polish J. Microbiol.** 63(1):43-49, 2014.

- RAEISPOUR, M; RANJBAR, R. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 118, 2018.
- RESTIERI, C., GARRISS, G., LOCAS, M. C., DOZOIS, C. M. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and references strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 5, p. 1553-1562, 2007.
- RUIZ-PEREZ, F., NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 5, p. 745-770, 2014.
- SANTOS, T. G. Patotipagem, tipagem filogenética, determinação de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* uropatogênica. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde) - **Universidade Federal de Goiás**, Jataí, 2018
- SHAKYA, P. et al. ESBL production among *E. coli* and *Klebsiella* spp. causing urinary tract infection: a hospital based study. **The open microbiology journal**, v. 11, p. 23, 2017.
- SHERLOCK, O; VEJBORG, R. M; KLEMM, P. The *TibA* adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 1954-1963, 2005.
- SILVA, E. K. C. **Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e antioxidante de extratos metanólico e aquoso de galhos da Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2020.
- SINGH, S. K; SEEMA, K; GUPTA, M. Detecção de AmpC β -lactamase e fatores de adesão em *Escherichia coli* uropatogênica isolada de pacientes idosos. **Patogênese microbiana**, v. 100, p. 293-298, 2016.
- STEIN, Markus et al. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 22, p. 6546-6554, 1996.
- TANDOGDU, Z; WAGENLEHNER, F. M. E. Global epidemiology of urinary tract infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 29, n. 1, p. 73-79, 2016.
- TAPADER, R; BASU, S; PAL, A. Secreted proteases: A new insight in the pathogenesis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 3-4, p. 159-168, 2019
- TEWAWONG, N. et al. Distribution of phylogenetic groups, adhesin genes, biofilm formation, and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Thailand. **PeerJ**, v. 8, p. e10453, 2020.

ULETT, G. C. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. **Current opinion in microbiology**. 16:1, 2013

VAN DER VALK, T; VAN DER MEIJDEN, A. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. **Toxicon**, v. 88, p. 38-43, 2014.

VAZQUEZ, N. M. et al. Cell death and biomass reduction in biofilms of multidrug resistant extended spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates by 1, 8-cineole. **PloS one**, v. 15, n. 11, p. e0241978, 2020.

WELLS, T. J. et al. EhaA is a *novel autotransporter protein of enterohemorrhagic Escherichia coli* O157: H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 3, p. 589-604, 2008.

YADAV, K.; PRAKASH, S. Screening of ESBL producing multidrug resistant *E. coli* from urinary tract infection suspected cases in southern Terai of Nepal. **Journal of Infectious Diseases and Diagnosis**, v. 2, n. 2, p. 116, 2017.

Figuras e legendas

Figura 1. Mapa dos locais dos pontos de coleta das amostras de UPEC.



Fonte: Google Earth Pro (2021)

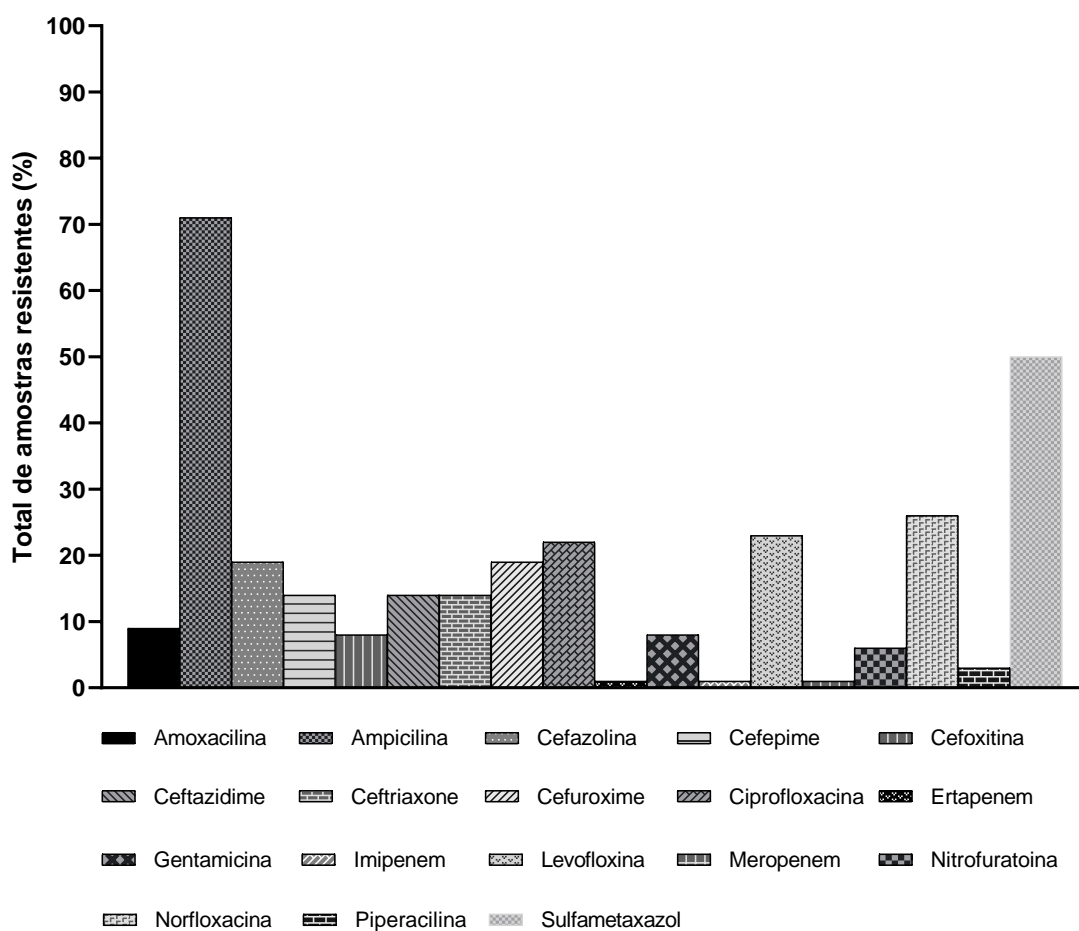


Figura 2. Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das amostras isoladas dos pacientes com ITU atendidos nos hospitais do Maranhão, no período de setembro a novembro de 2019.

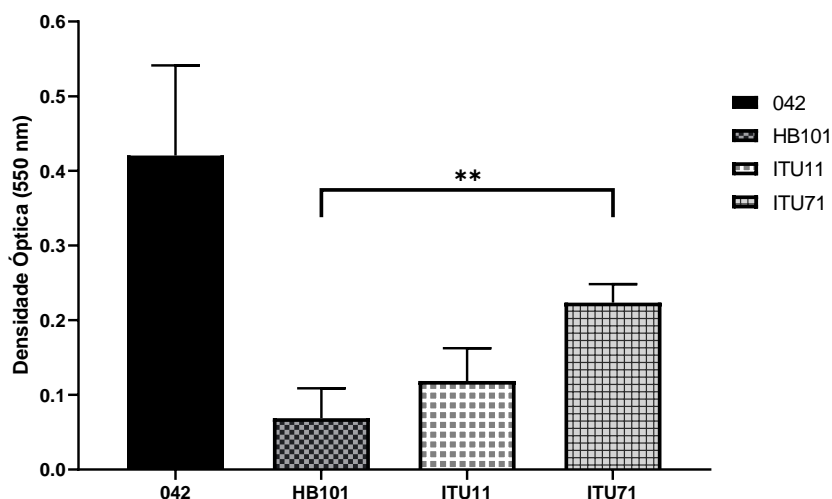


Figura 3. Formação de biofilme entre os isolados. A formação do biofilme foi avaliada a partir da capacidade do microrganismo em formar o biofilme na placa de 96 poços, que foi corada com cristal violeta a 0,5% e lida no leitor de ELIZA a 550 nm para a obtenção da densidade óptica, onde foi determinado que as amostras com $DO \leq 0,1$ foi considerado negativo e $DO > 0,1$ foi considerado positivo. Para o controle positivo foi utilizado uma amostra de *E. coli* EAEC 042 e para o negativo *E. coli* HB101. Os testes foram feitos em triplicatas e o resultado apresentado no gráfico é a média de cada amostra. Os (**) indicam diferença significativa para um valor de $p < 0,05$.

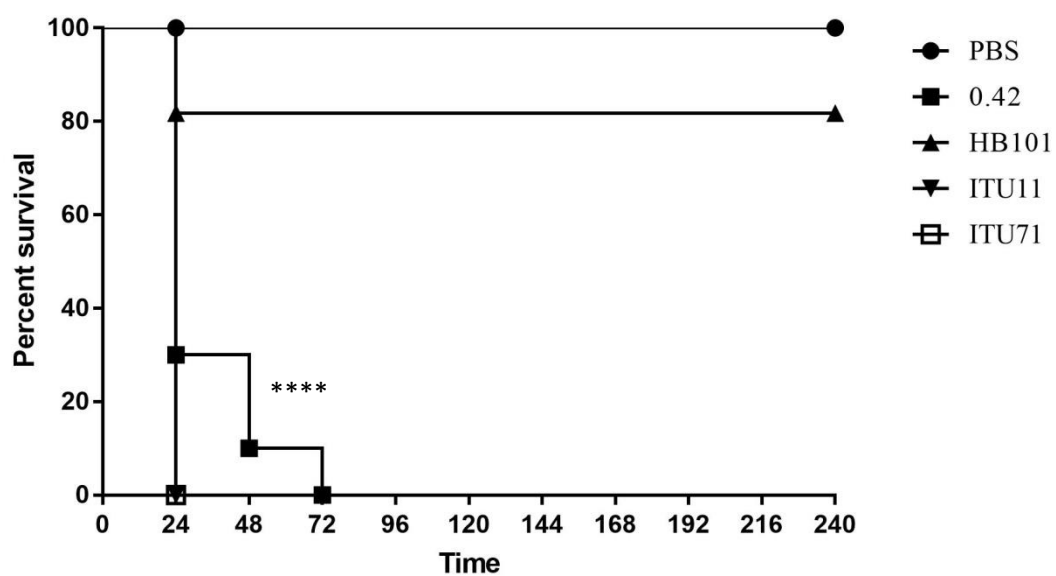


Figura 4. Avaliação do teste de toxicidade em larva de *T. molitor*. As larvas foram analisadas a cada 24 h durante dez dias. PBS foi inoculado no grupo controle; EAEC 042 foi o controle positivo; HB101 como controle positivo e ITU11 e ITU71 amostras clínicas. ****p-valor<0.0001, quando comparado com os demais grupos

Tabela 1. Sequência dos iniciadores, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR para os marcadores de virulência de genes autotransportadores.

Gene	Função	Sequência dos Iniciadores	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência
<i>ahaA</i>	Formação de biofilme (WELLS et al., 2008).	(F) CACAGATGACAGAAGGGA (R) GTTTACCCCACTCGTCAG	59	326	ABREU et al., 2013.
<i>ahaB</i>	Formação de biofilme (WELLS et al., 2008).	(F) CAGGGTTATGAGTGGGAAG (R) CCACTTGCTGCCGTTGTT	59	423	ABREU et al., 2013.
<i>ahaD</i>	Formação de biofilme (WELLS et al., 2008).	(F) GGCAGTTGACACGATTATTA (R) CTGTCGCTTTGCCATTATC	59	821	ABREU et al., 2013.
<i>ahaJ</i>	Formação de biofilme (EASTON et al., 2011)	(F) ACGGGCTGCTGAGTATTT (R) GTAGTTTGCCACATCACCG	60	455	ABREU et al., 2013.
<i>espC</i>	Clivagem do fator V da cascata de coagulação (MELLIES et al., 2001)	(F) TAGTGCAGTGCAGAAAGCAGTT (R) AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	55	301	RESTIERI et al., 2007.
<i>espP</i>	Clivagem de pepsinae fator V da cascata de coagulação (BRUNDER; SCHMIDT; KARCH; 1997).	(F) GTCCATGCAGGGACATGCCA (R) TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	55	547	RESTIERI et al., 2007.
<i>pic</i>	Hemaglutinação, degradação de mucina e do fator V da cascata de coagulação, clivagem de moléculas do complemento e glicoproteínas de leucócitos (HENDERSON et al, 1999; ABREU et al., 2015; ABREU et al., 2016; ABREU; BARBOSA, 2017)	(F) GGGTATTGTCCGTTCCGAT (R) ACAACGATACCGTCTCCCG	60	1.176	HENDERSON et al., 1999.
<i>tibA</i>	Formação de biofilme, adesão e agregação (SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005).	(F) ATGGTTGGCAGTGACGGTA (R) GGTTGTTGACGGACGGAAA	58	480	ABREU et al., 2013.

Tabela 2. Perfil etário dos pacientes com ITU atendidos nos hospitais do Maranhão, no período de setembro a novembro de 2019.

Gênero	N	%
Masculino	38	10,3
Feminino	338	89,7
Total	368	100

Faixa etária	N	%
Crianças (0-12 anos)	38	10,3
Jovens (13- 20 anos)	34	9,2
Adultos (21-59 anos)	238	64,7
Idosos (≥ 60)	58	15,8
Total	368	100

Legenda: **N** é igual a quantidade de amostra de cada parâmetro e **%** é igual a porcentagem do total de amostras analisadas.

Tabela 3. Detecção dos genes *espP*, *espC*, *tibA*, *pic*, *ehaA*, *ehaB*, *ehaD* e *ehaJ* nas amostras de ITU.

Genes	positivos	%
<i>ehaD</i>	165	44,83
<i>ehaB</i>	39	10,59
<i>pic</i>	34	9,23
<i>ehaA</i>	31	8,42
<i>ehaJ</i>	0	0
<i>tibA</i>	0	0
<i>espC</i>	0	0
<i>espP</i>	0	0

Controles positivos utilizados na PCR: EHEC EDL933 (genes *ehaABD* e *espP*); EAEC 042 (*pic*); EPEC E2348/69 (*ehaJ* e *espC*); ETEC H10407 (*tibA*).