

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Doenças Infecciosas e Parasitárias

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
UROPATOGÊNICA DA LINHAGEM ST131

THAÍS COSTA DA CONCEIÇÃO DE SOUSA

Rio de Janeiro
2025



PRODUÇÃO DE BIOFILME EM CEPAS DE *ESCHERICHIA*
COLI UROPATOGÊNICA DA LINHAGEM ST131

Thaís Costa da Conceição de Sousa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicada à Infectologia (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Káris Maria de Pinho Rodrigues
Prof^a. Dr^a. Karla Rodrigues Miranda
Dr^a. Ana Paula de Souza da Silva

Rio de Janeiro
Fevereiro/2025

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
UROPATOGÊNICA DA LINHAGEM ST131

Thaís Costa da Conceição de Sousa

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Káris Maria de Pinho Rodrigues
Prof^a. Dr^a. Karla Rodrigues Miranda
Dr^a. Ana Paula de Souza da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência Aplicada à Infectologia (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Aprovada por:

Presidente, Prof^a. Dr^a. Simone Aranha Nouér

Prof^a. Dr^a. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Rio de Janeiro
Fevereiro/2025

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marilucia e Eladio, por estarem sempre ao meu lado, dando a uma menina cheia de sonhos todo o apoio e carinho necessários para seguir em frente

Ao meu irmão, Pedro Lucas, por ser meu alívio e meu ponto de paz

Aos meus avós, Nancy e Damião, que estarão sempre em minha memória...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Dr^a Beatriz Meurer Moreira pela oportunidade, por me receber de braços abertos, com todo carinho, incentivo, paciência e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Karla Rodrigues Miranda, por todo o suporte, por todos os ensinamentos, pelo carinho, ânimo e paciência.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Káris Maria de Pinho Rodrigues, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço à minha Coorientadora Dr^a. Ana Paula de Souza da Silva, pelos ensinamentos e pela contribuição na elaboração deste trabalho.

Agradeço à minha amiga Dr^a. Isadora Barcellos, por todos os ensinamentos, pela colaboração, que foi fundamental para que o projeto seguisse adiante. Agradeço pela parceria e carinho.

Agradeço à minha querida amiga Dr^a. Fernanda Baptista, por todos os ensinamentos, pelo companheirismo e por permanecer ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Agradeço a todos os membros do L IMM. Aprendi muito com cada um de vocês. Agradeço pela amizade, pelos ensinamentos e por tornarem essa trajetória mais leve, com muito café e muitas risadas.

À Adriana Lucia Pires e ao laboratório DASA pelo fornecimento das amostras para o estudo.

RESUMO

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

UROPATOGÊNICA DA LINHAGEM ST131

Thaís Costa da Conceição de Sousa

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Káris Maria de Pinho Rodrigues

Prof^a. Dr^a. Karla Rodrigues Miranda

Dr^a. Ana Paula de Souza da Silva

Escherichia coli uropatogênica (UPEC) é o principal patógeno associado a infecção do trato urinário (ITU). As cepas de *E. coli* da linhagem ST131 são resistentes às fluoroquinolonas, produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e têm capacidade de produção de biofilme, que auxilia em sua adaptação e persistência, contribuindo para a disseminação. Cepas do ST131 são classificadas em clados (A, B e C), essa classificação é baseada na associação com alelos do gene *fimH*: *fimH41*, *fimH22* e *fimH30*, respectivamente. O clado C se subdivide em subclados (C0, C1, C2 e C1-M-27), que apresentam diferentes perfis de resistência. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de biofilme em amostras de *E. coli* ST131, obtidas de indivíduos com ITU de aquisição comunitária no estado do Rio de Janeiro, no ano de 2019. A produção de biofilme foi detectada pelo método semiquantitativo em superfície abiótica e genes de virulência foram pesquisados por PCR multiplex. Um total de 114 amostras foram obtidas, sendo 19 do clado A, 22 do B, 1 do C0. Dos subclados, 32 são do C1, 7 do C1-M-27 e 33 do C2. Dessas amostras, 22 foram produtoras de ESBL e 76 foram multirresistentes (MDR). A produção de biofilme foi detectada em 73 (64%) das amostras, sendo maior no subclado C1 (n=26, 81%), quando comparado ao C2 (n=18, 55%). Os genes *sfa/focDE*, *papG III*, que codificam adesinas e *hly*, que codifica uma hemolisina, foram mais frequentes em amostras produtoras de biofilme (11%, $p=0,03$; 10%, $p=0,05$ e 22%, $p=0,05$ respectivamente). Dentre as amostras produtoras de biofilme (n=73, 64%), 20% eram produtoras de ESBL e (21%) 79% eram MDR. Observamos uma elevada prevalência de amostras do ST131 formadoras de biofilme, porém a produção de biofilme não foi associada à produção de ESBL ou ao fenótipo MDR.

Palavras-chave: *Escherichia coli* uropatogênica, biofilme, infecção do trato urinário, fator de virulência, resistência a antimicrobianos.

Rio de Janeiro
Fevereiro/2025

ABSTRACT

BIOFILM PRODUCTION IN UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

ST131

Thaís Costa da Conceição de Sousa

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Káris Maria de Pinho Rodrigues

Prof^a. Dr^a. Karla Rodrigues Miranda

Dr^a. Ana Paula de Souza da Silva

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main pathogen associated with urinary tract infection (UTI). *E. coli* strains of the ST131 lineage are resistant to fluoroquinolones, producers of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and could have the ability to produce biofilm, which aids in their adaptation and persistence, contributing to dissemination. ST131 strains are classified into clades (A, B and C), this classification is based on the association with alleles of the *fimH* gene: *fimH41*, *fimH22* and *fimH30*, respectively. Clade C is subdivided in subclades (C0, C1, C2 and C1-M-27), which have different resistance profiles and subclades (C1, C2 and C1-M-27). The aim of this study was to evaluate biofilm production in *E. coli* ST131 samples obtained from individuals with community-acquired UTI in the state of Rio de Janeiro in 2019. Biofilm production was detected by the semi-quantitative method on abiotic surfaces and virulence genes were investigated by multiplex PCR. A total of 114 samples were obtained, 19 from clade A, 22 from B and 1 from C0. Of the subclades, 32 are from C1, 7 from C1-M-27 and 33 from C2. Of these samples, 22 were ESBL producers and 76 were multi-drug resistant (MDR). Biofilm production was detected in 73 (64%) of the samples, and was higher in the C1 subclade (n=26, 81%) compared to C2 (n=18, 55%). The *sfa/focDE*, *papG* III, which encode adhesins and *hly*, which encodes a hemolysin, genes were more frequent in biofilm-producing samples (11%, $p=0.03$; 10%, $p=0.05$ and 22%, $p=0.05$ respectively). Among the biofilm-producing samples (n=73, 64%), 20% were ESBL producers and (21%) 79% were MDR. We observed a high prevalence of biofilm-forming ST131 samples, but biofilm production was not associated with ESBL production or the MDR phenotype.

Key-words: Uropathogenic *Escherichia coli*, biofilm, urinary tract infection, Virulence factor, antimicrobial resistance.

Rio de Janeiro

Fevereiro/2025

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	2
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	4
LISTA DE TABELAS	5
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Infecção do trato urinário.....	4
3.2 <i>Escherichia coli</i>.....	6
3.3 <i>Escherichia coli</i> uropatogênica	7
3.4 Fatores de virulência em <i>Escherichia coli</i> uropatogênica	8
3.4.1 <i>Adesinas</i>.....	9
3.4.2 <i>Toxinas</i>.....	10
3.4.3 <i>Invasinas</i>	12
3.4.4 <i>Sistema de aquisição de ferro</i>	13
3.5 Biofilme.....	13

3.5.1	<i>Fatores de virulência envolvidos na produção do biofilme</i>	14
3.6	Resistência aos antimicrobianos	16
3.6.1	<i>Beta-lactâmicos e mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos</i> 17	
3.6.2	<i>Quinolonas e fluoroquinolonas</i>	20
3.7	Tipificação de <i>E. coli</i>	21
3.8	Linhagem ST131	22
4	JUSTIFICATIVA	25
5	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	Coleção do estudo	27
5.2	Detecção da produção de biofilme em superfície abiótica	28
5.3	Pesquisa dos genes que codificam fatores de virulência	30
5.4	Análise dos dados	34
5.5	Financiamento	34
5.6	Aspectos éticos	34
6	RESULTADOS	35
6.1	Produção de biofilme em superfície abiótica	35
6.2	Genes que codificam fatores de virulência	38
6.3	Frequência de amostras produtoras de ESBL e de amostras MDR	40
7	DISCUSSÃO	42
8	CONCLUSÕES	48

9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
10	ANEXO	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC3	Adenilil ciclase 3
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária (do inglês “avian pathogenic <i>E. coli</i> ”)
CC	Complexo clonal
CDT	Toxina de distensão citoletal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIP	Ciprofloxacina
CNF1	Fator necrosante citotóxico 1 (do inglês “cytotoxic necrotizing factor 1”)
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (do inglês “diffuse adhering <i>E. coli</i> ”)
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica (do inglês “diarrhoeagenic <i>E. coli</i> ”)
DASA	Laboratório Diagnósticos da América S. A.
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês “deoxyribonucleic acid”)
DO	Densidade óptica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (do inglês “enteroaggregative <i>E. coli</i> ”)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (do inglês “enterohemorrhagic <i>E. coli</i> ”)
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (do inglês “enteroinvasive <i>E. coli</i> ”)
EnPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica do endométrio (do inglês “endometrial pathogenic <i>E. coli</i> ”)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (do inglês “enteropathogenic <i>E. coli</i> ”)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (do inglês “enterotoxigenic <i>E. coli</i> ”)
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido (do inglês “extended-spectrum beta-lactamase”)
ESC	Cefalosporina de espectro estendido
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal (do inglês “extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> ”)
FQ-R	Resistência às fluoroquinolonas
FV	Fatores de virulência
HGT	Transferência Horizontal de genes
HlyA	Hemolisina A

IBCs	Comunidades bacterianas intracelulares
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
ITU	Infecção do trato urinário
ITU-RAS	Infecção do trato urinário relacionada à assistência à saúde
ITU-AC	Infecção do trato urinário adquirida na comunidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MBLs	Metalo-beta-lactamases
MDR	Resistente a múltiplos medicamentos antimicrobianos
MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS	(do inglês “multidrug-resistant”)
MLST	Tipificação por sequenciamento de múltiplos <i>loci</i> (do inglês “multilocus sequence typing”)
MPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para tecido mamário (do inglês “mammary pathogenic <i>E. coli</i> ”)
NMEC	<i>Escherichia coli</i> de meningite neonatal (do inglês “neonatal meningitis associated <i>E. coli</i> ”)
NOR	Norfloxacino
OMP	Proteínas de membrana externa
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMQR	Resistência a quinolona mediada por plasmídeo (do inglês “plasmid-mediated quinolone resistance”)
QRDR	Região de determinação da resistência às quinolonas
RAM	Resistentes aos antimicrobianos
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> de sepse (do inglês “sepsis pathogenic <i>E. coli</i> ”)
SPATE	Serina-protease autotransportadora de <i>Enterobacterales</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga (do inglês “shiga toxin producing <i>E. coli</i> ”)
ST	Tipo de sequência (do inglês “sequence type”)
TLR4	receptor Toll-like 4
TSA	Agar Triptona de Soja (do inglês “tryptic soy agar”)
TSB	Caldo Triptona de Soja (do inglês “Tryptic Soy Broth”)
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica (do inglês “uropathogenic <i>E. coli</i> ”)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Fluxograma de seleção de amostra	28
Figura 2.	Frequência de amostras segundo a produção total de biofilme.....	34
Figura 3.	Número de genes que codificam fatores de virulência por grupo produtor e não produtor de biofilme	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos genes que codificam fatores de virulência pesquisados.....	31
Tabela 2. Amostras de <i>Escherichia coli</i> utilizadas como controle para a detecção de genes que codificam fatores de virulência	31
Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes que codificam fatores de virulência	32
Tabela 4a. Frequência da produção de biofilme por clados, considerando o total de amostras produtoras comparado às não produtoras	36
Tabela 4b. Frequência da produção de biofilme por clados, considerando a estratificação da produção de biofilme forte e fraco comparado às não produtoras	37
Tabela 4c. Frequência da produção de biofilme por clados, considerando as amostras produtoras de biofilme forte vs as produtoras de biofilme fraco e as não produtoras em conjunto.....	37
Tabela 5. Frequência de genes de virulência presentes na produção de biofilme, considerando o total de amostras produtoras comparado às não produtoras.....	38
Tabela 6a. Distribuição de amostras produtoras de ESBL segundo a produção de biofilme.....	40
Tabela 6b. Distribuição de amostras com o perfil MDR segundo a produção de biofilme.....	40

1 INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) está entre as infecções bacterianas mais comuns na comunidade, sendo importante causa de morbidade e mortalidade, afetando principalmente mulheres, mas também homens, principalmente quando ocorrem ITU complicadas (Raynor e Carson, 2011). As ITU podem ser caracterizadas como infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e ITU adquiridas na comunidade (ITU-AC), sendo *Escherichia coli* o agente mais frequente (Drekonja e Johnson, 2008).

Entre os principais patógenos relacionados com ITU estão as amostras de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), principalmente *E. coli* uropatogênica (UPEC), uma linhagem adaptada, responsável por causar as infecções urinárias (Dale e Woodford, 2015).

O grande potencial de UPEC de causar infecções está na presença de mecanismos que facilitam a colonização e a infecção, denominados fatores de virulência (FV) (Gibreel *et al.*, 2012). Além disso, a aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos também constitui fator importante de amostras de UPEC associado à adaptação e persistência (Bunduki *et al.*, 2021).

Biofilme é um importante mecanismo na patogênese de UPEC pois auxilia na colonização, sendo responsável por ITU recorrente (Feng *et al.*, 2021). Além disso, o biofilme pode proteger fisicamente as células bacterianas dos antimicrobianos, auxiliando no escape do sistema imunológico do hospedeiro (Feng *et al.*, 2021).

O aumento da resistência aos antimicrobianos entre ExPEC está relacionado à expansão dos grupos clonais pandêmicos, tais como ST69, ST131, ST73 e ST95.

Dentre esses clones, destaca-se o ST131, resistente às fluoroquinolonas e com maior frequência de amostras produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (Matsumura *et al.*, 2017). A identificação dos grupos clonais é realizada por meio de uma técnica de tipificação “multilocus sequence typing” (MLST), que determina o “sequence type” (ST) de linhagens, permitindo a identificação das principais linhagens pandêmicas que causam infecções extraintestinais, principalmente ITU (Maiden *et al.*, 1998).

Neste sentido, a compreensão dos principais fatores envolvidos na expansão desses clones resistentes e virulentos, assim como sua capacidade em formar biofilme, se torna importante para o controle da sua disseminação e potencial em causar infecções, principalmente ITU-AC. Portanto, o presente projeto se propõe a analisar a produção de biofilme, associado à virulência e a resistência em amostras de UPEC isoladas de indivíduos na comunidade no Rio de Janeiro.

2 OBJETIVOS

O objetivo do projeto foi avaliar a produção de biofilme em amostras de *E. coli* uropatogênicas do clone pandêmico ST131, obtidas de indivíduos com ITU-AC no estado do Rio de Janeiro, no ano de 2019.

2.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a produção de biofilme nas amostras, classificando em biofilme forte, fraco e não produtoras
- b) Comparar a produção de biofilme entre as sublinhagens do ST131 (A, B, C0, C1, C1-M-27 e C2)
- c) Investigar a associação da produção de biofilme com a presença de genes que codificam fatores de virulência, resistência a múltiplos antimicrobianos (também referida como multirresistência, MDR) e produção de ESBL

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Infecção do trato urinário

A infecção do trato urinário (ITU) é uma patologia comum no ambiente hospitalar e na comunidade, sendo considerada uma das mais frequentes causas de infecções comunitárias. ITU ocorre, na maioria dos casos, quando um patógeno migra pela uretra até a bexiga e rins, causando a invasão e proliferação desse agente no sistema urinário (Tandogdu e Wagenlehner, 2016). Grande parte destas infecções são provocadas por bactérias fecais que ascendem do períneo até a uretra e bexiga. Estima-se que quase metade das mulheres e uma parte menor dos homens terão pelo menos uma ITU durante a vida (Mathai, Jones e Faller, 2001).

ITU pode ser classificada como recorrente e não recorrente, bacteriúria assintomática, infecção aguda (ITU inferiores, chamadas de cistites e ITU superiores, chamada de pielonefrite) e crônica (Foxman, 2013; Smelov *et al.*, 2016). A infecção recorrente é considerada como a ocorrência de três ou mais episódios de ITU por ano, ou duas ou mais ITU em menos de seis meses (Brumbaugh *et al.*, 2013; Nuutinen e Uhari, 2001; Terlizzi *et al.*, 2017). A bacteriúria assintomática ocorre em indivíduos sem sintomas urinários que apresentam crescimento de 10^5 UFC/mL (100 mil) bactérias ou em mais duas amostras consecutivas de urina em mulheres ou uma única amostra em homens (Kolman, 2019).

A cistite, também conhecida como ITU baixa ou infecção do trato urinário inferior, é uma infecção bacteriana aguda que afeta a bexiga. Já a uretrite refere-se a uma infecção com características semelhantes, mas que acomete especificamente a

uretra. Essas infecções podem ser classificadas como não complicadas e complicadas. Particularmente a cistite aguda não complicada, ocorre quando há ausência de condições predisponentes conhecidas que afetam diretamente o nível da ITU, sendo mais comum em mulheres em idade fértil. Os sintomas característicos da cistite aguda são: disúria, frequência ou urgência urinária, dor suprapúbica e, às vezes, dor lombar. A cistite complicada é mais comum em indivíduos do sexo masculino e está associada a fatores de risco do paciente como, o uso de cateteres urinários, obstrução do trato urinário (como por hipertrofia prostática benigna), procedimentos cirúrgicos no trato urinário, diabetes e gravidez, no caso de mulheres (Concia, Bragantini e Mazzaferri, 2017).

A pielonefrite aguda é conhecida como infecção alta ou ITU superior, refere-se à infecção no rim, sendo considerada mais grave. Os pacientes acometidos por pielonefrite frequentemente têm história de ITU anterior. Pielonefrite não complicada acomete indivíduos com ausência de alterações anatômicas urinárias e doenças de base (Moellering, 1997). A pielonefrite complicada ocorre em pacientes com alterações anatômicas e funcionais das vias urinárias (Moellering, 1997). *E. coli* é frequentemente encontrada, em casos complicados de pielonefrite, além disso, podem apresentar uma maior frequência de resistência aos antimicrobianos, o que propicia a evolução para casos mais graves tais como abscesso renal e pielonefrite enfisematosa (infecção rara e grave envolvendo bactérias formadoras de gases que resultam em necrose do parênquima renal) (Nicolle, 2007; Longo *et al*, 2012; Raynor e Carson, 2011).

As ITU complicadas são atribuídas à infecção em pacientes com sistema do trato urinário comprometido ou obstruído, ou pacientes que utilizam dispositivos médicos como cateteres. A ITU não complicada é comumente encontrada em

pacientes com sistema urinário saudável e sem uso de dispositivos médicos, o que é frequentemente observado em pacientes ambulatoriais, ou seja, infecções adquiridas na comunidade (Hooton, 2012; Lichtenberger e Hooton, 2008; Mann *et al.*, 2017).

Entre os patógenos que causam a ITU estão bactérias do trato intestinal, como *Escherichia coli*, e bactérias associadas a ITU relacionadas aos cuidados a saúde como por exemplo, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., além de bactérias Gram-positivas tais como *Enterococcus* spp. (Moellering, 1997; Foster, 2008). *E. coli* é o agente etiológico mais frequente na ITU de aquisição comunitária e hospitalar (Bunduki *et al.*, 2021).

3.2 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo, pertencente ao gênero *Escherichia* da família *Enterobacteriaceae*, da ordem *Enterobacterales* (Denamur *et al.*, 2020). *E. coli* é o anaeróbio facultativo mais frequente na microbiota intestinal humana, habitando de forma comensal (Ørskov, I., & Ørskov, 1985). A relação entre o hospedeiro e *E. coli* na microbiota intestinal é simbiótica, no qual a bactéria tem o crescimento favorecido por nutrientes presentes na microbiota, enquanto contribui para o desenvolvimento imunológico do trato intestinal (Kataoka, 2016).

As cepas comensais de *E. coli* raramente causam doença. Entretanto, algumas cepas de *E. coli* dispõem de elevada adaptação adquirida ao longo da sua evolução, com presença de FV que contribuem para a capacidade de causar uma variedade de doenças (Kaper *et al.*, 2004). Essas cepas podem ser classificadas em grupos ou patotipos de acordo com a produção dos FV e mecanismos por quais

causam a doença (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Os patótipos de *E. coli* associados à infecção intestinal são classificados em *E. coli* diarrreio gênica (DEC) (Kaper *et al.*, 2004). Dentre as cepas DEC os patótipos são divididos em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC) (Nataro e Kaper, 1998).

E. coli patogênica extraintestinal (ExPEC) são as cepas capazes de causar doenças extraintestinais e são divididas em patótipos de acordo com o local de infecção, tais como *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* causadora de sepse (SEPEC) (Kaper *et al.* 2004). Algumas amostras de ExPEC podem causar doenças em outros animais utilizando FV que também são encontrados em cepas que causam doenças em humanos, como *E. coli* aviária (APEC) que causa infecções respiratórias, pericardite e sepse em aves (Stromberg *et al.*, 2017), *E. coli* patogênica do tecido mamário (MPEC) responsável por causar mastite em bovinos (Blum *et al.*, 2018) e *E. coli* patogênica do endométrio (EnPEC) responsável por causar doença inflamatória pélvica em bovinos (Sheldon *et al.*, 2010).

3.3 *Escherichia coli* uropatogênica

Amostras de UPEC são a principal causa de ITU adquirida na comunidade (ITU-AC) e uma grande parte da ITU relacionada à assistência à saúde (ITU-RAS) (Bauckman *et al.*, 2019).

Assim, como amostras de *E. coli* comensais, UPEC está presente na

microbiota intestinal em uma relação simbiótica, porém esse patotipo se adaptou e adquiriu a capacidade de disseminar e colonizar outros ambientes do hospedeiro, como o trato urinário e a corrente sanguínea (quando ultrapassa a barreira epitelial renal e migra para a corrente sanguínea, acarretando bacteremia e infecção da corrente sanguínea) (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Amostras de UPEC no trato urinário, crescem e persistem, exibindo fatores e estratégias de virulência, como toxinas, que modificam e danificam o hospedeiro para promover a infecção (Shah *et al.*, 2019; Flores-Mireles *et al.*, 2015).

A capacidade da UPEC se ligar aos tecidos do hospedeiro é um dos principais fatores que facilitam a colonização das amostras desse patotipo no trato urinário, permitindo que as bactérias suportem o fluxo de urina e promovendo a invasão das células uroteliais (Eto *et al.*, 2007).

3.4 Fatores de virulência em *Escherichia coli* uropatogênica

A patogenicidade de patotipos de *E. coli* como UPEC está completamente associada a genes de virulência e outros elementos genômicos relacionados (Jahandeh *et al.*, 2015). Os FV mais comuns encontrados em UPEC são: adesinas, que facilitam a colonização e a produção de biofilme; toxinas, que ajudam as bactérias a se espalharem pelo tecido hospedeiro, interrompendo a integridade celular; invasinas, que auxiliam na evasão ao sistema imune do hospedeiro; sistema de secreção, essenciais para o crescimento bacteriano sendo utilizados tanto para atuar nas defesas do hospedeiro como para estabelecer seu nicho replicativo; e sideróforos, que fazem parte dos sistemas de captação de ferro auxiliando a sobrevivência bacteriana (Green *et al.*, 2016; Garenaux, Caza, & Dozois, 2011; Jahandeh, *et al.*, 2015; Lüthjee

Brauner, 2014).

3.4.1 Adesinas

A adesão é um fator importante na colonização de UPEC ao trato urinário. As principais adesinas encontradas em UPEC são as fímbrias P e as fímbrias do tipo I. As adesinas estão comumente nas superfícies das bactérias e são classificadas em proteínas filamentosas denominadas fímbrias, ou moléculas afimbriais (Slabchev; Pisavera; Markova, 2009). Essas proteínas estão ancoradas na membrana externa da bactéria. Em UPEC a adesão a células do uroepitélio é mediada por manose, e a interação a este receptor classifica as adesinas em relação a especificidade do receptor alvo (Bower, Eto e Mulvey, 2005). Nesta classificação em relação ao receptor, existem as adesinas sensíveis à manose, que exibem hemaglutinina manose-sensível, e as adesinas resistentes a manose, com hemaglutinina manose-resistente, que se aderem aos antígenos dos eritrócitos ou às células epiteliais (Jadhav *et al.*, 2011; Johnson, 2003; Slavchev; Pisavera; Markova, 2009).

As fímbrias tipo I e P são montadas pela via chaperona-usher e estão entre as fímbrias bacterianas mais bem caracterizadas; porém, a expressão constitutiva da fímbria tipo I leva à regulação negativa da expressão do gene da fímbria P (Snyder *et al.*, 2005).

A fímbria do tipo I está presente em quase todas as cepas de *E. coli*. Dentro da bexiga as fímbrias do tipo I ligam-se ao uroepitélio através das glicoproteínas manosiladas; especificamente, *FimH* (adesina na ponta da fímbria tipo 1) medeia a interação com a D-manose em glicoproteínas. É um fator importante no desenvolvimento de cistite, promovendo a ligação interbacteriana, resultando na

formação de comunidades bacterianas intracelulares (IBC), que causam obstrução do fluxo tubular (Subashchandrabose e Mobley, 2015).

Fímbrias P são codificadas pelos genes *pap* conhecidos como pili. Essa fímbria é associada principalmente a pielonefrite (Lüthje e Brauner, 2014). Neste caso, a aglutinação é resistente à manose de eritrócitos humanos, e *papG* é a adesina que se liga aos glicosíngolipídeos contendo porções digalactosídeos encontrados no epitélio renal. Além da adesão, as fímbrias P ainda estão relacionadas à regulação de motilidade (Subashchandrabose e Mobley, 2015).

Outros dois grupos de adesinas resistentes à manose são a adesina afimbrial (AFA)/família Dr e a família S/F1C. Membros da família AFA/Dr são diversos, sendo codificadas tanto em plasmídeos quanto em seqüências cromossômicas. Na família de fímbrias S ocorre o reconhecimento de receptores contendo ácido siálico. Essa família está relacionada ao acometimento de meningite neonatal. Já as fímbrias F1C estão relacionadas à ITU e bacteremia (Johnson, 2003).

3.4.2 Toxinas

As toxinas são proteínas que promovem lesão nas células hospedeiras, causando anormalidades na função ou morfologia da célula, interrupção do ciclo celular ou lise celular (Lüthje e Brauner, 2014). As principais toxinas encontradas em linhagens de ExPEC incluem alfa hemolisina, fator citotóxico necrosante-1 (CNF-1), toxina de distensão citoletal (CDT) e toxina autotransportadora secretada (Johnson, 2003).

A hemolisina (HlyA) é um importante membro das famílias de toxinas, que contém um nanopeptídeo rico em glicina característico no domínio C-terminal. Além

de ser uma hemolisina (lise de eritrócitos), possui toxicidade em outras células como em leucócitos. A ativação, produção e exportação da hemolisina ocorre por proteínas codificadas pelo operon *hlyCABD* (Wiles e Mulvey, 2013). Os genes *hlyA* e *hlyC* são responsáveis pela ativação da hemolisina através da codificação de um acil transferase. A hemolisina é secretada pela atuação de HlyB e HlyD em conjunto com TolC (uma proteína de membrana externa), já que a secreção de HlyA é dependente de energia (Wiles e Mulvey, 2013). Além da atividade citolítica, HlyA também atua na comunicação entre hospedeiro e patógeno, degrada proteínas de suporte do citoesqueleto e proteínas envolvidas na sinalização de células B ativadas (Dhakal e Mulvey, 2012).

O CNF-1 está presente em uma variedade de cepas de UPEC, participa da ativação de GTPases, incluindo RhoA e Rac1, que são proteínas importantes para diversos processos celulares como fagocitose e explosão oxidativa em neutrófilos (Subashchandrabose e Mobley, 2015). Através de CNF-1 ocorre a interrupção das vias de sinalização da Rho GTPase, levando a uma desregulação imune, além da produção de CNF-1 ter uma vantagem durante a sobrevivência na presença de neutrófilos (Davis, Rasmussen, O'Brien, 2005; Rippere-Lampe *et al.*, 2001).

Outra toxina produzida por UPEC são as proteínas autotransportadoras secretadas (Sat) e hemaglutinina sensível à temperatura (Tsh). Ambas fazem parte da família de proteínas SPATE (serina-protease autotransportadora de *Enterobacteriales*) (Heimer *et al.*, 2004). A Sat induz vacuolização nas células do túbulo renal proximal e desregula a migração de leucócitos e inflamação através da intervenção em moléculas de adesão como CD43, CD44, CD45 e CD93, além de participar da comunicação entre patógeno e hospedeiro (Guyer *et al.*, 2000; Maroncle *et al.*, 2006).

3.4.3 Invasinas

A invasão permite que amostras de UPEC escapem de certas defesas do hospedeiro e da ação de antibióticos. Esta invasão ocorre para que as amostras bacterianas possam se multiplicar e provocar a infecção (Johnson, 1991). Os FV relacionados à invasão são: proteína Ibe, síntese de cápsula (kpsMIII) e resistência ao soro (TraT) (Johnson, 1991).

Ibe, codificada pelo gene *IbeA*, está relacionada à invasão de células vasculares cerebrais, portanto é encontrada comumente em cepas de *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC). A síntese de cápsula está relacionada à família de antígenos que fornecem capacidade de perfuração da cápsula para um ataque posterior à célula (Johnson, 1991). A proteína TraT é uma lipoproteína de membrana externa de 25 kDa. É o principal componente da membrana externa de algumas cepas de *E. coli* e confere um grau moderado de resistência ao soro interferindo na via de sinalização do sistema complemento (Johnson, 1991).

O mecanismo de defesa do hospedeiro contra a invasão de UPEC é a exocitose, um mecanismo de expulsão que depende da expressão do receptor Toll-like 4 (TLR4) presente em células uroepiteliais (Flores-Mireles *et al.*, 2015). A ativação mediada por lipopolissacarídeo (LPS) de TLR4 estimula a adenilil ciclase 3 (AC3) a produzir AMP cíclico, que induz a exocitose de UPEC; porém, quando o patógeno consegue escapar para o citoplasma, a UPEC pode subverter a via de expulsão e se multiplicar rapidamente, formando comunidades bacterianas intracelulares (IBC) semelhantes a biofilmes (Flores-Mireles *et al.*, 2015). O processo de invasão e formação de IBC fornece à UPEC a capacidade de sobreviver e persistir no trato urinário, esfoliação de células da bexiga, ascensão aos rins, micção e inflamação

(Flores-Mireles *et al.*, 2015).

3.4.4 Sistema de aquisição de ferro

O ferro é um micronutriente limitante para as células bacterianas no hospedeiro, um nutriente escasso no trato urinário. A aquisição de ferro é importante para cepas de *E. coli*, pois auxilia no transporte e armazenamento do oxigênio, realização da síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos (Parvez e Rahman, 2018). Diversos mecanismos são utilizados por essas bactérias para extrair ferro do hospedeiro, estes mecanismos são moléculas com alta afinidade ao ferro e recuperam este elemento sequestrado por proteínas hospedeiras. Os principais sistemas sideróforos reconhecidos incluem os sistemas *aerobactina*, *enterobactina* e *yersiniabactina*, além dos receptores sideróforos recentemente identificados IreA e IroN (Johnson, 2003; Subashchandrabose e Mobley, 2015).

3.5 Biofilme

Os biofilmes são comunidades bacterianas complexas, envoltas por uma matriz extracelular composta por lipoproteínas e polissacarídeos, podendo ser formados por uma variedade de espécies, incluindo *E. coli* (Subashchandrabose e Mobley, 2015). Biofilme é importante na patogênese de UPEC pois auxilia na colonização e invasão e escape ao sistema imunológico do hospedeiro, sendo responsável por ITU recorrentes (Feng *et al.*, 2021). Além disso, o biofilme pode proteger fisicamente as células bacterianas dos antimicrobianos e auxiliar no escape do sistema imunológico do hospedeiro. Já foi descrito que os biofilmes abrigam um grande número de enzimas inativadoras de antibióticos como beta-lactamases,

criando assim uma ilha de resistência antimicrobiana (Feng *et al.*, 2021; Davies J & Davies D, 2010).

Estudos indicam que os biofilmes estão associados a uma parcela significativa das infecções humanas. Estima-se que 80% das infecções humanas estejam associadas a biofilmes bacterianos, especialmente aquelas que envolvem dispositivos médicos, como próteses e cateteres. O biofilme também desempenha um papel importante na transferência horizontal de genes (HGT) facilitada por grande densidade de células em estreita proximidade contribuindo para o movimento de genes de resistência e fatores de virulência, especialmente sob pressão seletiva de antibióticos (Trentin *et al.*, 2014; Henriques *et al.*, 2013).

De acordo com Houdt e Michiels (2005) a formação de uma estrutura do biofilme inicia-se com células planctônicas (células de vida livre), que se aproximam e se aderem a uma superfície sólida através de adesinas específicas (pili e fímbrias). Em seguida, ocorrem as divisões celulares, formando microcolônias que produzem substância poliméricas extracelulares, em uma estrutura complexa envolta por uma cápsula que retém nutrientes do meio ambiente.

Essa estrutura passa por um processo de maturação e, em seguida, mediada por sinalizações intercelulares, ocorre a lise da cápsula, e as bactérias são liberadas em retorno ao estado planctônico para o ambiente circundante, podendo reiniciar o ciclo em um novo ponto de infecção (Houdt e Michiels, 2005; Monroe D *et al.*, 2007).

3.5.1 Fatores de virulência envolvidos na produção do biofilme

Diversos FV estão relacionados à produção dos biofilmes. A adesão mediada por fímbrias é importante para a fixação das células bacterianas às superfícies

abióticas e biológicas (neste caso, iniciam a colonização e posteriormente infecção) (Garnett e Matthews, 2012).

Outro fator importante para a formação de biofilme são os flagelos, que garantem motilidade para as células bacterianas. A motilidade dos flagelos promove o contato inicial célula-superfície, possivelmente superando as forças repulsivas, e pode contribuir para a disseminação de bactérias em crescimento ao longo uma superfície abiótica (Pratt e Kolter, 1998).

Proteínas autotransportadoras são importantes para a indução da formação das microcolônias, além de aumentar potencialmente a colonização no intestino de mamíferos (Danese *et al.*, 2002). Essas proteínas em *E. coli* são codificadas pelo gene *Agn43* e dão origem ao antígeno 43, que estabelece a autoagregação das células bacterianas por meio de interações Ag43-Ag43, induzindo a formação de microcolônias e assim promovendo a formação do biofilme (Houdt e Michiels, 2005).

A hemolisina é uma toxina que induz a lise de células hospedeiras, facilitando a disseminação bacteriana e a formação de biofilmes. O CNF-1 ativa constitutivamente as GTPases da família Rho, promovendo a reorganização do citoesqueleto celular e contribuindo para a formação de biofilmes. A expressão de genes que induzem a produção de hemolisina A e CNF-1 é inibida pela presença de *rfaH*, uma proteína antiterminadora transcricional de *E. coli*, além disso a perda desse inibidor (*rfaH*) leva a um aumento do fenótipo de biofilme em cepas de UPEC (Beloin *et al.*, 2006).

O ferro é um micronutriente importante para a produção de biofilmes. A análise das proteínas metalorreguladoras do ferro na modulação do biofilme indicou que a formação do biofilme em *E. coli* é reduzida pela limitação de ferro sob condições ricas em nutrientes, e as células bacteriana maduras presentes no biofilme são sensíveis à

ruptura por limitação de ferro (Subashchandrabose e Mobley, 2015).

As fímbrias do tipo I, codificadas pelo cluster de genes *fim*, desempenham um papel crucial na formação de biofilmes. Sendo essenciais na fase inicial de adesão bacteriana, sendo responsáveis pela mediação da ligação específica entre as bactérias e os receptores presentes nas superfícies do hospedeiro ou em superfícies bióticas ou abióticas. A proteína metalorreguladora de Fe-S IscR regula a formação de biofilme em *E. coli* controlando a expressão de fímbrias do tipo I que estão envolvidas na ligação celular irreversível durante o desenvolvimento do biofilme (Lasa *et al.*, 2005; Wue e Outten, 2008).

3.6 Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos representa uma grande ameaça para os sistemas de saúde e para a economia global. É um problema que tem evoluído rapidamente nas últimas décadas, incluindo as infecções adquiridas na comunidade (Morrison e Zembower, 2020). As infecções causadas por microrganismos multirresistentes a drogas (MDR) estão associadas ao aumento da mortalidade quando comparadas com as causadas por bactérias sensíveis aos antimicrobianos (Munita e Arias, 2016). A globalização teve um impacto significativo na disseminação da resistência antimicrobiana, uma vez que a mobilidade populacional é o fator principal na distribuição de organismos resistentes (MacPherson, 2009).

A resistência aos antimicrobianos pode ocorrer através de mecanismos intrínsecos ou adquiridos. Os mecanismos intrínsecos são aqueles especificados por genes de ocorrência natural encontrados no cromossomo do hospedeiro, como *AmpC* e beta-lactamase de bactérias Gram-negativas e sistemas de efluxo MDR (Aleksun

e Levy, 2007). Os mecanismos adquiridos envolvem mutações em genes direcionados pelo antibiótico e a transferência de determinantes de resistência em plasmídeos, bacteriófagos, transposons e outros elementos genéticos móveis (Liu e Pop, 2009).

Algumas cepas de *E. coli* relacionadas às infecções adquiridas na comunidade, como ITU, são causadas por bactérias MDR. Estas cepas apresentam a capacidade de resistir a três ou mais classes de antimicrobianos. (Magiorakos et al., 2011). A resistência a fluoroquinolonas por amostras de *E. coli* tem aumentado constantemente ao longo dos anos (Nicolas-Chanoine, Bertrand e Madec, 2014). Esse aumento da resistência antimicrobiana entre as amostras de *E. coli* está relacionado, dentre outros fatores, com a expansão clonal de amostras de *E. coli* do ST131, uma linhagem pandêmica MDR com plasmídeos que possuem genes que codificam as ESBL (Matsumura et al, 2013).

3.6.1 Beta-lactâmicos e mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos estão entre as classes de antimicrobianos mais utilizados contra doenças infecciosas. O sucesso clínico do primeiro beta-lactâmico, a penicilina G (benzilpenicilina), levou à busca e desenvolvimento de seus derivados (Babic et al., 2006). Essa busca deu origem aos antibióticos beta-lactâmicos em uso clínico que até o momento são divididos em quatro principais classes: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas (Babic et al, 2006).

Os beta-lactâmicos caracterizam-se pela presença do anel beta-lactâmico inibindo a síntese da parede bacteriana. O anel beta-lactâmico é composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio (Arruda et al, 2019). Os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos têm efeitos bactericidas interrompendo a síntese da

parede celular bacteriana e se ligando a proteínas de ligação à penicilina (PBP) inibindo a transpeptidação do peptídeoglicano pela penicilina (Bush e Bradford, 2016).

A resistência aos beta-lactâmicos pode ser mediada por alguns mecanismos distintos, como por exemplo: produção de beta-lactamases; alterações no sítio ativo de PBP (diminuem a afinidade aos beta-lactâmicos); diminuição da expressão de proteínas de membrana externa (OMP) (proteínas importantes para que os beta-lactâmicos consigam chegar até as PBP na membrana interna); e bombas de efluxo (exportam o agente antimicrobiano do periplasma da célula para o ambiente externo) (Drawz e Bonomo, 2010).

3.6.1.1 *Beta-lactamases*

As beta-lactamases são enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico, impedindo a ação desses antimicrobianos. A primeira classificação para as beta-lactamases de acordo com Ambler (1980) foi relacionada com suas características estruturais. Posteriormente Bush e cols. (1995) também classificou as beta-lactamases de acordo com o substrato e perfil de inibidor.

Na classificação de Ambler, as enzimas são divididas em classes de A a D, de acordo com a sequência de aminoácidos. As classes A, C e D incluem enzimas que hidrolisam seus substratos formando uma enzima acil através de uma serina do sítio ativo, enquanto as beta-lactamases da classe B são metaloenzimas que utilizam pelo menos um íon zinco do sítio ativo para facilitar a hidrólise de beta-lactâmicos (Ambler, 1980). Para a classificação de Bush, as enzimas foram alinhadas com base em sua capacidade de hidrolisar classes específicas de beta-lactâmicos e nas propriedades de inativação dos inibidores de beta-lactamase ácido clavulânico, sulbactam e

tazobactam. Essa classificação possui três grupos: (classe C, Ambler) grupo 1; (classes A e D, Ambler) grupo 2 e (classe B, Ambler) grupo 3 (Bush e Jacoby, 2010).

No grupo 1 estão as cefalosporinases pertencentes à classe molecular C que são codificadas no cromossomo de muitas espécies de *Enterobacteriaceae*. As principais enzimas do grupo 1 são: AmpC, CMY, ACT, FOX e MIR. As enzimas do grupo 1 podem conferir resistência aos carbapenêmicos, principalmente ao ertapenem. No grupo 2, encontram-se as serino-beta-lactamases, que estão na classe molecular A e D de Ambler, representam o maior grupo de beta-lactamases e neste grupo estão as ESBL (TEM e SHV) capazes de hidrolisar as principais classes de beta-lactâmicos. No grupo 3, estão presentes as metalo-beta-lactamases (MBL). As MBL possuem capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, têm baixa afinidade ou capacidade hidrolítica para monobactâmicos e não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. IMP e VIM são exemplos de enzimas deste grupo (Bush e Jacoby, 2010).

ESBL é um grupo de beta-lactamases de grande importância epidemiológica, por terem se tornado endêmicas em todo mundo. ESBL são serinas beta-lactamases-grupo 2, de acordo com a classificação de Bush e classe A, de acordo com a classificação de Ambler (Castanheira, 2021). ESBL são capazes de hidrolisar beta-lactâmicos de espectro estendido, porém são inibidas por inibidores da beta-lactamase, especificamente clavulanato (Bush e Jacoby, 2010). Embora apresentem propriedades bioquímicas de hidrólise semelhantes, os genes que codificam essas enzimas são de natureza diversa e dessa forma passam a ser agrupadas em várias famílias (Bradford, 2001). Algumas dessas famílias são: do tipo TEM, SHV, OXA e CTX-M (Rupp e Fey, 2003).

3.6.2 Quinolonas e fluoroquinolonas

As quinolonas são uma das classes de antimicrobianos mais utilizadas atualmente, principalmente em ITU. O mecanismo de ação das quinolonas está relacionado com a inibição da síntese de DNA bacteriano, agindo nas enzimas de replicação bacteriana, como a DNA girase e topoisomerase II e IV. DNA girase é o alvo primário de bactérias Gram negativas, enquanto a topoisomerase IV o alvo de espécies Gram-positivas (Aldred, 2014). Durante a síntese, as quinolonas se ligam no sítio ativo de clivagem do complexo enzima-DNA, e com a enzima aprisionada incapaz de se juntar ao substrato de DNA, induz a fragmentação do DNA e à morte celular bacteriana (Sultan *et al.*, 2021).

Na década de 1980, com a ampla utilização das quinolonas, foi desenvolvida uma segunda geração com atividade melhorada, com maior penetração de Gram-positivos e farmacocinética aprimorada, conhecido como fluoroquinolonas (Correia *et al.*, 2017). A resistência às quinolonas e fluoroquinolonas pode ser classificada de acordo com o tipo de mecanismo: resistência por mutações cromossômicas que alteram as enzimas-alvo (DNA girase e topoisomerase); resistência cromossômica por mutações que levam à redução do acúmulo de drogas por absorção diminuída ou efluxo aumentado; e genes plasmidiais (Correia *et al.*, 2017; Aldred, 2014).

As mutações genéticas ocorrem frequentemente em uma curta sequência de DNA classificada como região de determinação da resistência às quinolonas (QRDR), que levam a alterações estruturais nas enzimas alvos (Aldred, 2014). As principais mutações que estão relacionadas com a resistência às quinolonas são específicas, que codificam as enzimas topoisomerase II. Estas mutações ocorrem em *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* (Sultan *et al.*, 2021).

A resistência às quinolonas também é mediada por plasmídeos (PMQR). Alguns dos genes que conferem resistência a quinolonas carregados por plasmídeos, são os da família de genes *qnr*. São mais de 100 variantes descritas sendo as proteínas Qnr classificadas em seis grupos distintos: QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD e QnrVC. As proteínas Qnr pertencem à família de proteínas de repetição de pentapeptídeos e conferem resistência às quinolonas, protegendo fisicamente a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição das quinolonas (Sultan *et al.*, 2021; Correia *et al.*, 2017).

Outro mecanismo de PMQR, descoberto em 2006, consiste na modificação de alvo pela enzima AAC(6')-Ib-cr (Johnson *et al.*, 2015). AAC(6')-Ib-cr é uma variante da AAC(6')-Ib, uma aminoglicosídeo acetiltransferase que foi modificada pela aquisição de duas mutações (W102R e D179Y) necessárias para sua função de acetiltransferase (Robicsek *et al.*, 2006). AAC(6')-Ib-cr reduz a atividade de ciprofloxacina (CIP) e norfloxacina (NOR) por N-acetilação, através de um grupo piperazinil não substituído (Vetting *et al.*, 2008).

3.7 Tipificação de *E. coli*

A tipificação consiste na identificação de microrganismos com perfil semelhante, ou seja, amostras clonais. Os clones são organismos que possuem características fenotípicas ou genotípicas em comum definidas por algum método de tipificação (Riley, 2014).

Diferentes métodos de tipificação podem ser empregados para identificação dos clones. *Multilocus sequence typing* (MLST) é um método que consiste em amplificar fragmentos de DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR) e

sequenciar os fragmentos. Os genes estudados codificam reações importantes para a manutenção da vida celular, também chamados de *housekeeping* (Maiden *et al.*, 1998). Para cada gene, as sequências com discretas diferenças são denominadas de alelos, e o conjunto de alelos fornece um perfil que define o *sequence type* (ST) (Enright e Spratt, 1999). Os ST que apresentam variação de um ou dois alelos são agrupados em um mesmo complexo clonal (CC) (Maiden *et al.*, 1998). Para *E. coli*, os genes de manutenção utilizados são: *adk*, *fumC*, *gyB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA* (Wirth *et al.*, 2006).

Doumith e colaboradores (2015) desenvolveram uma multiplex PCR para detectar quatro das principais linhagens pandêmicas de *E. coli*: ST69, ST131, ST73 e ST95. Estes clones possuem alto risco de disseminação global, alguns são multirresistentes, com capacidade de colonização, patogênicos, e contribuem para a disseminação de genes de resistência e virulência (Riley, 2014). Além disso esses clones são grandes responsáveis por infecções causadas por linhagens de ExPEC e vários estudos relataram a predominância de amostras do ST69, ST131, ST73 e ST95 entre grandes coleções de ExPEC causando infecções em humanos (Tartof *et al.*, 2005; Adams-Sapper, 2013; Doumith *et al.*, 2015).

3.8 Linhagem ST131

A linhagem ST131 de *E. coli* é atualmente estudada dentre as linhagens clonais pandêmicas de ExPEC, corresponde predominantemente ao sorogrupo O25b:H4 e ao filogrupo B2. Trata-se de uma linhagem produtora de ESBL, principalmente do tipo CTX-M, frequentemente codificada em plasmídeo, e resistente a fluoroquinolonas, devido a mutações em *gyrA* e *parC* (Riley, 2014). A origem do

ST131 ainda é desconhecida; porém, em meados dos anos 2000, foram relatados no Reino Unido e no Canadá, um clone de *E. coli* com presença de CTX-M, que foi posteriormente identificado como pertencendo ao ST131. Em 2008, *E. coli* ST131 foi identificada com *bla*_{CTX-M-15} em três diferentes continentes, em países como Espanha, França, Canadá, Portugal, Suíça, Líbano, Kuwait e Coréia (Mathers *et al.*, 2015; Coque *et al.*, 2008; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

O ST131 é a linhagem de ExPEC responsável por causar grande parte das infecções resistentes aos antimicrobianos (RAM), tanto aquelas associadas a cuidados à saúde, quanto adquiridas na comunidade. ST131 é responsável pela disseminação da resistência às fluoroquinolonas e às cefalosporinas, que são antibióticos frequentemente usados para tratar infecção da corrente sanguínea e ITU (Pitout e Vinney, 2017).

Outra característica do ST131 é a presença de diversos genes que codificam FV. Os genes de virulência são comumente encontrados em cepas pertencentes ao grupo B2 (Russo e Johnson 2000). Em *E. coli* do ST131 foram encontrados em maior frequência os seguintes genes que codificam FV: *sat* (toxina autotransportadora secretada); *fimH* (fímbrias tipo 1); *fyuA* (receptor de yersiniabactina); *kpsM II* (síntese de cápsula do grupo 2); *usp* (proteína específica de uropatógeno), *malX* (marcador de ilha de patogenicidade); *iha* (receptor de sideróforo de adesina); *ompT* (receptor de membrana externa); *iucD* (aerobactina); *iutA* (receptor de aerobactina) e *trtT* (resistência ao soro) (Nicolas-Chanoine, Bertrand e Madec, 2014).

A maioria das cepas de *E. coli* ST131 abrigam o gene *fimH* (Johnson *et al.*, 2001). De acordo com o *fimH*, *E. coli* ST131 pode ser ainda dividida em sublinhagens, denominados clados A, B e C0. O clado A é classificado pela presença do *fimH41*, clado B por *fimH22* e clado C0 por *fimH30* (Pitout e Vinney, 2017). Em meados da

década de 1990 o clado B era o predominante; porém, na década de 2000, o clado C0 passou a ser o dominante na linhagem e atualmente encontra-se em até 80% das amostras do ST131 (Nicolas-Chanoine, Bertrand e Madec, 2014). O clado C0 ainda pode ser subdividido em C1/H30R (associado ao FQ-R), C2/H30-Rx (associado a ESBL CTX-M-15), ambos com ampla distribuição global (Pitout e Vinney, 2017) e em C1-M-27 (Associado a ESBL CTX-M-27). Em 2006, o subclado C1-M-27-27 foi identificado no Japão. Desde 2010, os casos dessa linhagem aumentaram, com sua presença também confirmada em cepas ST131 de diferentes regiões, como Tailândia, Austrália, Canadá e Estados Unidos (Pitout e Vinney, 2017; Matsumura *et al.*, 2017). Um estudo desenvolvido por Minh-Duy Phan e colaboradores relata uma alta prevalência do gene *aac(6')-Ib-cr* codificado por plasmídeos no clado C2 do ST131 (Phan *et al.*, 2022).

A disseminação de *E. coli* do ST131 está relacionada com plasmídeos de resistência pertencentes a grupos de incompatibilidade (Inc) com replicons F (IncF), que apresentam grande distribuição entre as linhagens de *E. coli*, principalmente no clado C2. Além disso, a presença de diversos fatores de virulência desempenha um papel na entrada, adesão, colonização, aquisição de nutrientes essenciais e disseminação dentro do trato urinário. A formação do biofilme com a aquisição de todos esses fatores, auxilia na persistência de UPEC no trato urinário, causando pielonefrite e até mesmo ITU crônica e recorrente. Podendo assim, levar a um aumento na gravidade da infecção e induzindo resistência antimicrobiana (Mirzahosseini HK *et al.* 2023).

4 JUSTIFICATIVA

As ITU são infecções bacterianas comuns na comunidade, sendo *E. coli* o mais frequente agente causador (Feng *et al.*, 2021). Amostras de *E. coli* identificadas como clones pandêmicos (como por exemplo ST69, ST131, ST73 e ST95) representam grande parte dos casos das ITU-AC (Riley, 2014; Manges *et al.*, 2019). O ST131 é a linhagem de ExPEC que causa grande parte das infecções por agentes MDR, tanto em infecções associadas a cuidados à saúde, quanto adquiridas na comunidade. ST131 é responsável pela disseminação da resistência às fluoroquinolonas e às cefalosporinas, que são antibióticos frequentemente usados para tratar infecção da corrente sanguínea e ITU (Pitout e Vinney, 2017). Esse clone pode ser subdividido em clados com variados fenótipos de resistência.

A emergência do ST131 pode estar relacionada ao potencial patogênico geneticamente estruturado, característico da combinação do perfil de resistência e virulência, que favorece a sua patogenicidade nas infecções extraintestinais (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Johnson JR *et al.*, 2010). Dos poucos estudos que avaliam a frequência desse clone no Brasil, dois do nosso grupo de pesquisa buscaram investigar a prevalência da resistência aos antimicrobianos em UPEC de ITU-AC e observaram aumento da frequência de resistência em amostras do ST131 do ano de 2015 para o ano de 2019 (Souza da-Silva *et al.*, 2020; de Castro, 2022). Porém poucos estudos no Brasil avaliam o potencial virulento desse clone, como a produção de biofilme.

A capacidade de produção de biofilme se destaca por auxiliar na persistência do microrganismo nas superfícies bióticas e, conseqüentemente, no estabelecimento de

uma infecção. O biofilme produzido por bactérias uropatogênicas pode ser considerado como facilitador de grande parte das ITU recorrentes. Além disso, a capacidade de bactérias produtoras de ESBL em formar biofilme dificulta ainda mais o tratamento com antibióticos e contribui para aumento de mortalidade e gravidade das infecções (Sanjeev Neupane *et al.*, 2016).

A linhagem ST131 de UPEC é formada em sua maior parte por amostras resistentes às fluoroquinolonas e produtoras de ESBL, principalmente do tipo CTX-M-15. Além disso, amostras ST131 utilizam vários FV que conferem aptidão para ganhar entrada, aderir, adquirir nutrientes essenciais, multiplicar-se em um ambiente hostil, causar danos aos tecidos e disseminar-se dentro do trato urinário (Subashchandrabose & Mobley 2015).

Visto que o conjunto desses FV pode estar associado ao sucesso e à persistência de microrganismos que causam ITU, tornou-se relevante investigar, em amostras do clone ST131, a frequência e intensidade da produção de biofilme e sua associação com diferentes clados, presença de genes que codificam esses FV, e a presença de fenótipos associados à resistência a antimicrobianos como perfil MDR e produção de ESBL.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleção do estudo

Trata-se de um estudo transversal, realizado com uma coleção previamente estabelecida e montada pelo laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), composta por amostras de *E. coli* isoladas de indivíduos com ITU-AC residentes no Rio de Janeiro do ano de 2019, enviadas do laboratório DASA.

As 992 amostras de *E. coli* recebidas do DASA foram caracterizadas previamente em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (de Castro, 2022; Isadora Silva Barcellos, Tese de Doutorado em andamento, dados não publicados). As amostras tiveram a identificação confirmada como *E. coli* por MALDI-TOF, a tipificação em ST realizada por PCR multiplex, e a tipificação dos clados e subclados do ST131 por PCR simplex. As amostras foram submetidas a teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão, sendo consideradas MDR as que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos conforme proposto (Magiorakos *et al.*, 2011). A produção de ESBL foi pesquisada por disco-aproximação. Todos esses processos de identificação, tipificação dos STs, tipificação dos clados e subclados e testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados nos estudos iniciais.

Para compor a coleção do presente estudo, foram selecionadas todas as amostras de *E. coli* do ST131, representando 114 amostras, 12% da coleção original de ITU-AC. Essas amostras foram utilizadas para o ensaio de produção de biofilme e pesquisa de genes que codificam FV. Dentre as 114 amostras, 19 (17%) pertencem

ao clado A, 22 (19%) ao clado B, 1 (0,9%) ao clado C0, 32 (28%) ao subclado C1, 7 (6%) ao subclado C1-M-27 e 33 (29%) ao subclado C2; 22 (19%) são produtoras de ESBL e 76 (67%) são MDR (Figura 1).

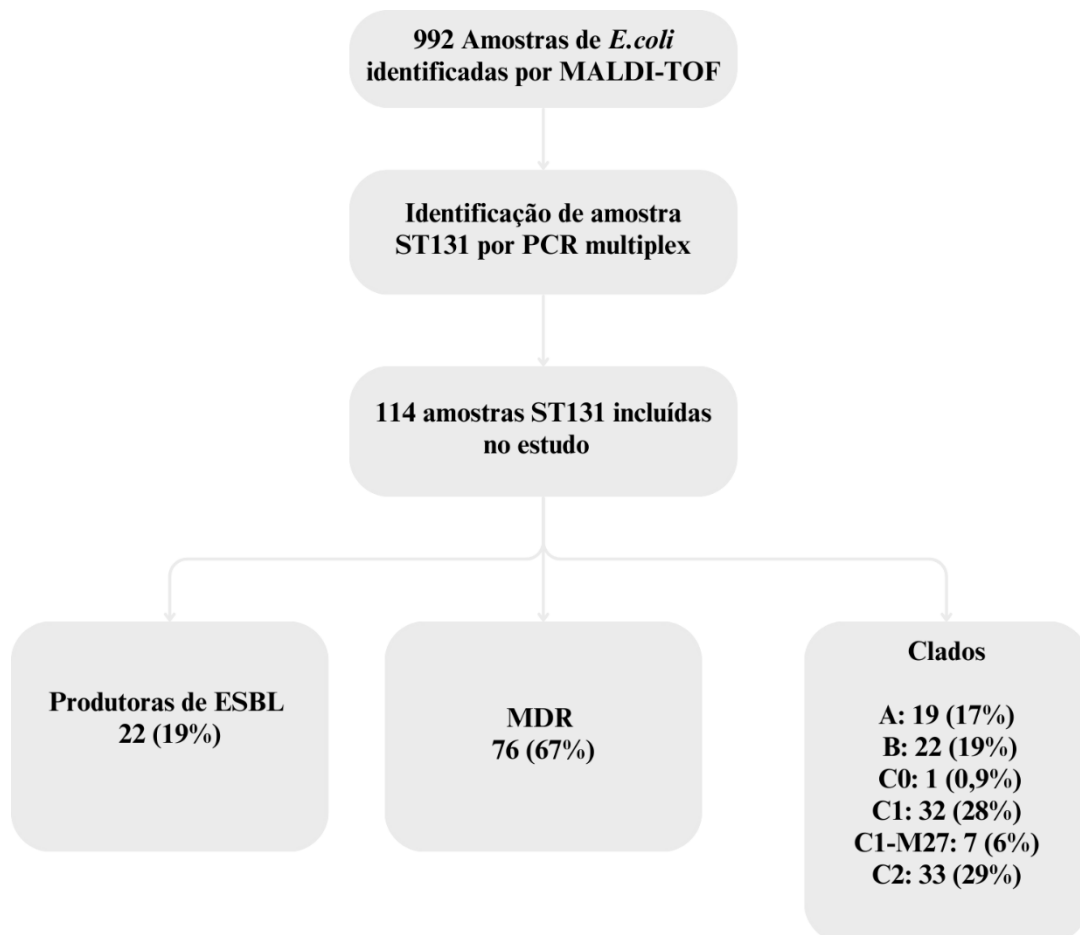


Figura 1. Fluxograma da seleção de amostras

ESBL: beta-lactamase de espectro estendido; MDR: resistente a múltiplos antimicrobianos

5.2 Detecção da produção de biofilme em superfície abiótica

Os ensaios de produção de biofilme foram realizados para as 114 amostras de *E. coli* do ST131, de acordo com a metodologia de Stepanovick *et al.*, (2007). As amostras foram cultivadas em *tryptic soy agar* (TSA) na estufa a 37 °C em aerobiose, por 18-24 h. Em seguida, uma colônia foi transferida para 3 mL de Tryptic Soy Broth

(TSB) e a cultura foi incubada a 37 °C, por 18-24 h. Após a incubação, foram realizadas diluições seriadas de 1:10 e 1:100 do caldo de bactérias crescidas em TSB, sendo 200 µL da diluição 1:100 inoculados em poços de placas de microtitulação de poliestireno estéreis com fundo chato de 96 poços. A placa foi incubada em aerobiose, em estufa a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, o conteúdo foi removido por inversão da placa e o material foi fixado em calor a 60 °C por 60 min. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS 1x estéril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM, Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2). Para corar o biofilme, foram adicionados 200 µL de solução de cristal violeta 0,1% (p/v) em cada orifício, e a placa ficou em temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período o corante foi removido e os poços foram lavados novamente com PBS 1x para remoção do excesso de corante. Posteriormente, o biofilme corado presente nos orifícios foi eluído com solução 80% etanol e 20% acetona (v/v), por 30 min.

A microplaca foi submetida a leitura no leitor de microplaca no espectro de 590 nm, utilizando o software SoftMax® pro 5.4.1. Em cada placa, as amostras foram testadas em triplicata, utilizando-se a cepa EAEC 042 (amostra fortemente produtora de biofilme) como controle positivo, a cepa HB 101 como controle negativo, e como controle do meio (o “branco”) utilizou-se caldo TSB sem inóculo. Cada ensaio foi repetido três vezes, e foi realizado o cálculo da média da densidade óptica (DO) para os poços referentes ao “branco”. Foi realizado o cálculo da média para os valores de DO dos poços amostrais e, com o resultado obtido, foi realizada uma subtração pela média dos valores do branco para obter a DO final. Após a realização da triplicata da placa, foi calculada a média final das DO para cada amostra.

Os seguintes parâmetros foram utilizados para classificar os fenótipos de produção de biofilme: Biofilme forte > 1,0; biofilme fraco > 0,4 < 1,0; e não produtor de

biofilme < 0,4, de acordo Stepanovick *et al.*, (2007).

5.3 Pesquisa dos genes que codificam fatores de virulência

Foi pesquisada a presença de 13 genes de virulência e um marcador de uma ilha de patogenicidade uropatogênica (Tabela 1) para as 114 amostras por multiplex PCR (MORENO *et al.*, 2005). As amostras de referência para controle da reação estão descritas na Tabela 2. Os iniciadores, seus respectivos alvos, e os tamanhos esperados dos amplicons estão descritos na Tabela 3.

A amplificação foi realizada em cinco reações diferentes para os genes específicos, descritas a seguir. As reações foram: Multiplex PCR 1, volume final 15 µL, contendo 7,5 µL de Master Mix (Promega), 1,0 µL de cada iniciador (15 pmol/µL), e 1,5 µL da suspensão bacteriana contendo DNA; Multiplex PCR 2, volume final 12 µL, contendo 6,0 µL de Master Mix (Promega), 0,5 µL de cada iniciador (15 pmol/µL), e 1,0 µL da suspensão bacteriana contendo DNA e o restante de água ultrapura; Multiplex PCR 3, 4 e 5, volume final 10 µL, contendo 5,0µL de Master Mix (Promega), 0,5 µL de cada iniciador (15 pmol/µL), 1,0 µL da suspensão bacteriana contendo DNA e o restante de água ultrapura. Os ciclos de amplificação das cinco reações foram compostos por uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 12 min, 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 63 °C por 30 s e 68 °C por 3 min, e uma etapa final de extensão de 72 °C por 7 min. Após a amplificação do DNA, a revelação do produto foi feita com eletroforese em gel de agarose a 1,5% com 0,5 µg/mL de brometo de etídio visualizado sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Descrição dos genes que codificam fatores de virulência pesquisados

Fatores de virulência	Gene	Produto ou função
Adesinas	<i>papA</i>	Subunidade estrutural da fímbria P
	<i>papG</i>	Adesina fimbrial P, com alelos I, II e III
	<i>afa/draBC</i>	Adesinas afimbriais e ligantes-Dr
	<i>sfa/focDE</i>	Fímbrias e F1C
Toxinas	<i>hlyA</i>	Hemolisina
	<i>cnfI</i>	Fator necrotizante citotóxico
Sideróforos	<i>iutA</i>	Receptor de aerobactina
	<i>fyuA</i>	Receptor de yersiniabactina
Invasinas	<i>KpsM TII</i>	Síntese de cápsula
	<i>traT</i>	Resistência ao soro
	<i>ibeA</i>	Invasão do endotélio microvascular cerebral
Miscelânea	<i>malX</i>	Marcador de ilha de patogenicidade

Fonte: Johnson & Stell, 2000

Tabela 2. Amostras de *Escherichia coli* utilizadas como controle para a detecção de genes que codificam fatores de virulência

Gene de virulência	Amostras controles de <i>E. coli</i>				
	ATCC BAA-457	KS52	J96	RS 218	20001
<i>papA</i>	POS	NEG	POS	POS	NEG
<i>papGII</i>	POS	NEG	NEG	NEG	POS
<i>papGIII</i>	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
<i>afa/draBC</i>	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
<i>sfa/focDE</i>	POS	NEG	NEG	POS	NEG
<i>hlyA</i>	POS	NEG	POS	NEG	NEG
<i>cnf1</i>	NEG	POS	POS	NEG	NEG
<i>iutA</i>	POS	POS	NEG	POS	NEG
<i>fyuA</i>	POS	POS	NEG	POS	NEG
<i>kpsMT II</i>	POS	POS	NEG	NEG	NEG
<i>traT</i>	POS	NEG	NEG	POS	POS
<i>ibeA</i>	NEG	POS	NEG	POS	NEG
PAI(<i>MaLX</i>)	NEG	NEG	POS	POS	NEG

POS: controle positivo, gene presente; NEG: controle negativo, gene ausente

Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes que codificam fatores de virulência

Gene Alvo	Nome	Sequência (5' – 3')	Tm (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
Mistura 1				
<i>malX</i> , PAI	RPAi-f	ggacatcctgttacagcgcgca	73,3	930
	RPAi-r	tcgccaccaatcacagccgaac	75,2	
<i>papA</i>	PapA-f	atggcagtgggtcttttgggtg	68,1	720
	PapA-r	cgccccaccatacgtgctcttc	69,7	
<i>fimH</i>	FimH-f	tgcagaacggataagccgtgg	71,1	508
	FimH-r	gcagtcacctgccctccggta	72,6	
<i>ibeA</i>	ibe10-f	aggcaggtgtgcgccgctac	77,2	170
	ibe10-r	tggtgctccggcaaacatgc	76,3	
Mistura 2				
<i>fyuA</i>	FyuA-f	tgattaaccccgcgacgggaa	74,0	880
	FyuA-r	cgcagtaggcacgatgttgta	65,9	
<i>sfa/focDE</i>	sfa1	ctccggagaactgggtgcatcttac	71,3	410
	sfa2	cggaggagtaattacaacctggca	69,3	
<i>iutA</i>	AerJ-f	ggctggacatcatgggaactgg	71,8	300
	AerJ-r	cgtcgggaacggtagaatcg	71,4	
<i>papG</i> allele III (interno)	Allele III-f	ggcctgcaatggatttacctgg	70,1	258
	Allele III-r	ccaccaaatgaccatgccagac	70,6	
Mistura 3				
<i>hlyA</i>	hly-f	aacaaggataagcactgttctggct	66,8	1177
	hly-r	accatataagcggctattcccgtca	71,3	
* <i>papG</i> allele I (interno)	AlleleI-f	tcgtgctcaggtccggaattt	69,9	461
	AlleleI-r	tggcatcccccaacattatcg	70,5	
* <i>kpsMT</i> II	kpsII-f	gcgcatttgcgatactgttg	65,4	272
	kpsII-r	catccagacgataagcatgagca	68,2	
Mistura 4				
<i>traT</i>	traT-f	ggtgtggtgcatgagcacag	71,5	290
	traT-r	cacggttcagccatccctgag	71,2	
<i>papG</i> allele II (interno)	Allele II-f	gggatgagcggcctttgat	71,3	190
	Allele II-r	cgggcccccaagtaactcg	70,7	
Mistura 5				
* <i>afa/draBC</i>	afa-f	ggcagagggccggcaacaggc	79,5	559
	afa-r	cccgtaacgcgccagcatctc	74,6	
* <i>cnf1</i>	cnf1	aagatggagtctctatgcaggag	65,4	498
	cnf2	cattcagagtctgccctcattatt	67,0	

Tm: temperatura de fusão. * oligonucleotídeos utilizados em concentrações mais baixas.

5.4 Análise dos dados

Os dados foram analisados com o auxílio do programa IBM SPSS® Statistics v 29. Diferenças entre as variáveis categóricas foram analisadas por teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Um valor de p bicaudal igual ou menor do que 0,05 foi definido como estatisticamente significativo.

5.5 Financiamento

O apoio financeiro foi fornecido pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro nº260003/005900/2024.

5.6 Aspectos éticos

O presente estudo não envolve a participação do paciente, sendo utilizada análise das amostras bacterianas de *E. coli* do ST131 isoladas de indivíduos com ITU-AC residentes no Rio de Janeiro em 2019. Não foi possível o contato com o paciente a partir do qual foi isolada. Desta forma, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Solicitação de Isenção de Obtenção de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e aprovado sob o código CAAE: 59953322.9.0000.5257. O documento parecer do consubstanciado do CEP encontra-se no Anexo.

6 RESULTADOS

6.1 Produção de biofilme em superfície abiótica

Dentre as 114 amostras analisadas, 73 (64%) produziram e 41 (36%) não produziram biofilme. Em relação às produtoras de biofilme, 44 (39%) produziam biofilme forte e 29 (25%) produziram biofilme fraco (Figura 2).

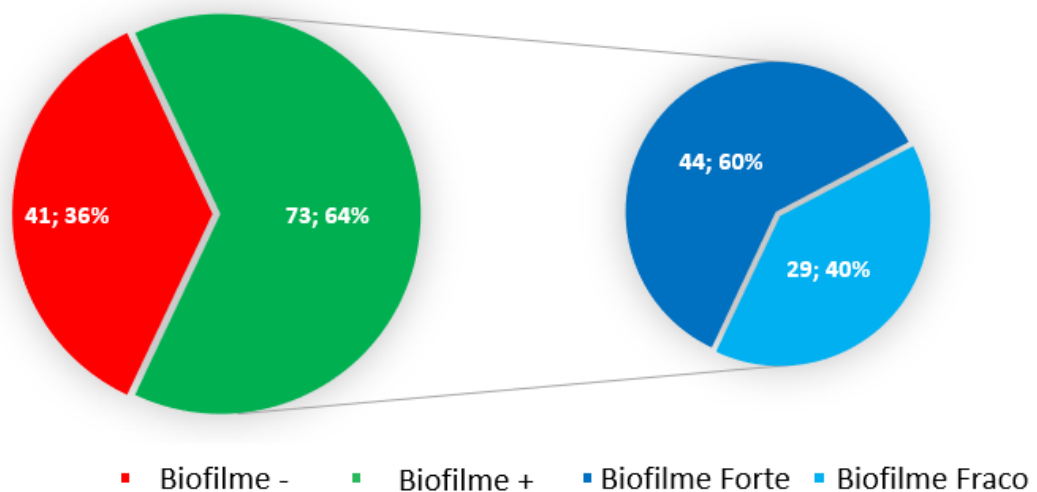


Figura 2. Frequência de amostras segundo a produção total de biofilme

Considerando apenas as divisões em clados (e não sub clados), observamos que a produção de biofilme foi maior no Clado C (N=49, 67%), seguido do Clado B (N=14, 64%) e Clado A (N=10, 53%) (todas as diferenças $p > 0,05$). Em seguida, analisamos a produção considerando os diferentes Clados e Subclados em separado, excluindo o Clado C0 que incluiu apenas uma amostra e o Subclado C1-M-27 que incluiu apenas sete amostras. Em todos os grupos, a frequência de amostras produtoras de biofilme foi $>50\%$, sendo maior no Clado C1 (n=26, 81%). Observamos

diferença com significado estatístico na comparação entre o número de amostras produtoras de biofilme no Clado C1 comparado ao Clado C2 (N=18, 55%; $p=0,04$), sendo o significado marginal na comparação do Clado C1 com o Clado A (N=10, 53%; $p=0,06$) e comparado ao Clado B (N=14, 64%; $p=0,1$) não observamos resultados com significância estatística (Tabela 4a). Os valores de densidade óptica para cada amostra de cada clado encontram-se nas tabelas A1, A2 e A3 no Anexo.

Tabela 4a. Frequência da produção de biofilme por clados, considerando o total de amostras produtoras comparado às não produtoras

N (%) de amostras		
Clado N=114	Produtoras de Biofilme N=73 (64)	Não produtoras N=41 (36)
A, 19 (17)	10 (53)	9 (47)
B, 22 (19)	14 (64)	8 (36)
C0, 1 (0,9)	1	0
C1, 32 (28) ^{a,b,c}	26 (81)	6 (19)
C1-M-27, 7 (6)	4 (57)	3 (43)
C2, 33 (29)	18 (55)	15 (46)

^aComparado ao Clado A: $p=0,06$; ^bComparado ao Clado C2: $p=0,04$; ^cComparado ao Clado B: $p=0,1$;

N: número; %: percentual

Considerando os produtores de biofilme forte e fraco comparado ao grupo de amostras não produtoras de biofilme nos Clados e Subclados, a frequência da produção de biofilme forte foi maior no Clado B (N=10, 45%) e no Subclado C1 (N=14,

44 %). Já no grupo dos produtores fracos, a maior frequência foi observada no Subclado C1 (N=12, 38%) e as maiores frequências de não produção de biofilme, foram observadas no Clado A (N=9, 47%) e no Subclado C2 (N=15, 46%), como mostra a Tabela 4b. Não observamos nenhuma diferença com significado estatístico ($p>0,05$).

Tabela 4b. Frequência da produção de biofilme por clados, considerando a estratificação da produção de biofilme forte e fraco comparado às não produtoras

Clado N=114	N (%) de amostras		
	Produtoras de Biofilme		Não produtoras N=41 (36)
	Forte N=44 (60)	Fraco N=29	
A, 19 (17)	6 (32)	4 (21)	9 (47)
B, 22 (19)	10 (45)	4 (18)	8 (36)
C0, 1 (0,9)	0	1	0
C1, 32 (28)	14 (44)	12 (38)	6 (19)
C1-M-27, 7 (6)	3 (43)	1 (14)	3 (43)
C2, 33 (29)	11 (33)	7 (21)	15 (46)

Todas as comparações: $p>0,05$; N: número; %: percentual

Na comparação entre amostras produtoras de biofilme forte e as produtoras de biofilme fraco em conjunto com as não produtoras (Tabela 4c) não observamos nenhuma diferença com significado estatístico ($p>0,05$).

Tabela 4c. Frequência da produção de biofilme por clados, considerando as amostras produtoras de biofilme forte, as produtoras de biofilme fraco e as não produtoras em conjunto

Clado N=114	Número (%) de amostras	
	Produtoras de biofilme forte N=44	Produtoras de biofilme fraco e não produtoras N=70
A, 19 (17)	6 (32)	13 (68)
B, 22 (19)	10 (45)	12 (54)
C0, 1 (0,9)	0	1
C1, 32 (28)	14 (44)	18 (57)
C1-M-27, 7 (6)	3 (43)	4 (57)
C2, 33 (29)	11 (33)	22 (67)

Todas as comparações: $p > 0,05$; N: número; %: percentual

6.2 Genes que codificam fatores de virulência

As 114 amostras foram submetidas à PCR multiplex para detecção dos genes que codificam FV. Em relação à produção de biofilme, os genes *sfa/focDE* (11%, $p=0,03$), *papG III* (10%, $p=0,05$) e *hly* (22%, $p=0,05$) foram mais frequentes em amostras produtoras de biofilme em comparação às amostras não produtoras (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de genes de virulência presentes na produção de biofilme, considerando o total de amostras produtoras comparado às não produtoras

Gene	Número (%) de amostras				<i>p</i>
	Produtoras de biofilme			Não produtoras N=41 (36)	
	Total N=73 (64)	Forte N=44 (60)	Fraco N=29 (40)		
<i>Rpai</i>	58 (80)	36 (82)	22 (76)	31 (76)	0,6
<i>papA</i>	20 (27)	15 (34)	5 (17)	8 (20)	0,3
<i>ibeA</i>	12 (16)	8 (18)	4 (14)	8 (20)	0,7
<i>fyuA</i>	72 (99)	43 (98)	29	41	0,5
<i>Sfa/focDE</i>	8 (11)	6 (14)	2 (7)	0	0,03
<i>Aerj</i>	65 (89)	38 (89)	27 (93)	34 (83)	0,4
<i>papG III</i>	7 (10)	5 (11)	2 (7)	0	0,04
<i>hly</i>	16 (22)	11 (25)	5 (17)	3 (7)	0,05
<i>papG I</i>	0	0	0	0	NA
<i>kps II</i>	49 (67)	31 (71)	18 (62)	31 (76)	0,3
<i>traT</i>	51 (70)	30 (68)	21 (72)	32 (78)	0,3
<i>papG II</i>	13 (18)	7 (16)	6 (21)	5 (12)	0,4
<i>afaB</i>	17 (23)	9 (21)	8 (28)	15 (37)	0,1
<i>cnfI</i>	14 (19)	7 (16)	7 (24)	3 (7)	0,09

NA: não se aplica; N: número; %: percentual

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os números de genes que codificam FV, presentes entre amostras que produzem e não produzem biofilme ($p=0,96$) (Figura 3).

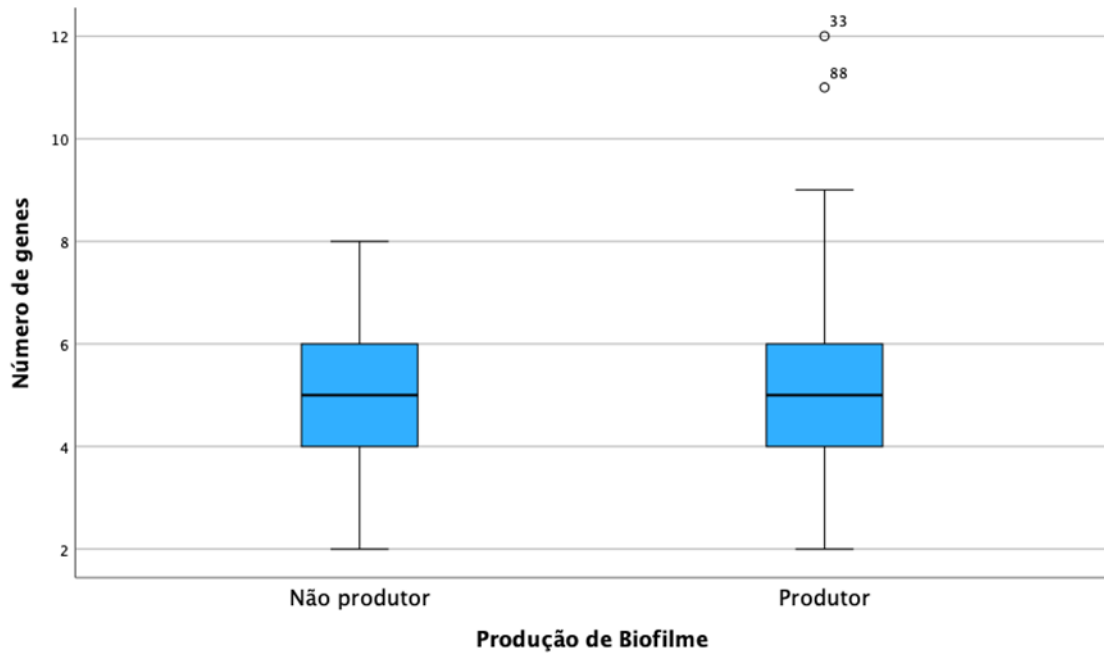


Figura 3. Número de genes que codificam fatores de virulência por grupo produtor e não produtor de biofilme

6.3 Frequência de amostras produtoras de ESBL e de amostras MDR

Das 73 (64%) amostras produtoras de biofilme, 14 (19%) eram produtoras de ESBL. Já entre as 41 (36%) amostras não produtoras de biofilme, 8 (18%) eram produtoras de ESBL. A frequência de amostras produtoras de ESBL nestes dois grupos foi similar (sem diferença com significado estatístico, $p=0,83$) (Tabela 6a).

Dentre as amostras com o perfil MDR, 49 (67%) eram produtoras de biofilme. Já nas amostras não produtoras de biofilme, 27 (66%) eram MDR e 14 (3%) não eram MDR ($p=0,94$; Tabela 6b).

Tabela 6a. Distribuição de amostras produtoras de ESBL segundo a produção de biofilme

Clado N (%)	Produtoras de ESBL N=22 (19)		
	Produtora de biofilme N=14 (19)	Não produtora de biofilme N=8 (20)	Total
	A, 19 (17)	0	0
B, 22 (19)	3 (14)	1 (5)	4 (18)
C0, 1 (0,9)	0	0	0
C1, 32 (28)	0	0	0
C1-M-27, 7 (6)	4 (57)	3 (43)	6 (27)
C2, 33 (29)	10 (30)	7 (21)	17 (52)

Comparação da produção de biofilme com amostras produtoras de ESBL ($p=0,83$); N: número; %: percentual

Tabela 6b. Distribuição de amostras com o perfil MDR segundo a produção de biofilme

Clado N (%)	Amostras MDR N=76 (67)		
	Produtora de biofilme N=49 (67)	Não produtora de biofilme N=27 (66)	Total
	A, 19 (17)	9 (47)	7 (37)
B, 22 (19)	4 (18)	2 (9)	6 (27)
C0, 1 (0,9)	1	0	1
C1, 32 (28)	18 (56)	4 (13)	22 (69)
C1-M-27, 7 (6)	3 (43)	2 (29)	5 (71)
C2, 33 (29)	14 (42)	12 (36)	26 (79)

Comparação da produção de biofilme com amostras MDR ($p=0,94$); N: número; %: percentual

7 DISCUSSÃO

Biofilmes são cruciais para a sobrevivência, adaptação e disseminação bacteriana em diversos ambientes, facilitando as trocas de genes entre os microrganismos envolvidos (Ito *et al.*, 2020 e Król *et al.*, 2019). As ITU representam um grande desafio para a saúde, e sua ocorrência é facilitada pela capacidade dos uropatógenos formarem biofilmes (Zhao *et al.*, 2020). Reconhecendo a importância desse FV, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de biofilme em 114 amostras de UPEC do clone pandêmico ST131, obtidas de indivíduos com ITU-AC no estado do Rio de Janeiro, no ano de 2019.

Os resultados obtidos por meio da análise de produção de biofilme, utilizando o método semiquantitativo em placas de poliestireno de 96 poços, evidenciaram que 73 (64%) das amostras apresentaram produção de biofilme. Dentre estas, 44 (60%) foram categorizadas como produtoras de biofilme forte e 29 (40%) como produtoras de biofilme fraco. Esses dados indicam uma alta prevalência da formação de biofilme forte, observada em 39% da coleção.

Um estudo conduzido por Ebrahimi e cols. em 2023, avaliou a capacidade de formação de biofilme em 120 cepas de *E. coli* isoladas de infecções da corrente sanguínea de pacientes admitidos em um hospital localizado na cidade de Teerã, Irã. Os resultados indicaram que a produção de biofilme nas 20 cepas da linhagem ST131 foi significativamente mais prevalente em comparação com as 100 amostras provenientes de outras linhagens. Além disso, foi observado que 45% das cepas ST131 apresentaram produção de biofilme forte. Estes achados são consistentes com os resultados obtidos no presente estudo, reforçando a importância clínica do biofilme,

uma vez que esse mecanismo se mostra estreitamente associado à linhagem ST131, amplamente reconhecida por sua implicação em diversas infecções (Johnson *et al.*, 2010).

Estudos apontam a elevada frequência de formação de biofilme por amostras de UPEC, tanto obtidas de pacientes internados quanto de pacientes ambulatoriais. A formação de biofilme desempenha um papel crucial na persistência de *E. coli* no trato urinário e em dispositivos clínicos, como cateteres urinários (Soto *et al.*, 2007). Isso favorece a recorrência e gera complicações, agravando as ITU. Essa estrutura permite que as bactérias se mantenham no trato urinário por mais tempo, dificultando o tratamento com agentes antimicrobianos (Naziri *et al.*, 2021). Assim, a investigação da formação de biofilme em amostras de UPEC pode dar subsídios ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas e de prevenção mais eficazes para ITU recorrente.

Neste trabalho, a análise da produção de biofilme entre os diferentes clados do ST131 revelou predominância do clado C, com uma taxa de produção de biofilme de 67%, seguida do clado B (64%) e clado A (53%). A avaliação estratificada dos subclados C indicou que, em comparação às demais sublinhagens, C1 apresentou a maior frequência de amostras produtoras de biofilme (81%, $p < 0,05$). Em contraste com os resultados obtidos neste estudo, alguns autores descrevem uma fraca capacidade de formação de biofilme em cepas do ST131, sobretudo no clado C (Zhang *et al.*, 2021; Flament-Simon *et al.*, 2019). Essas evidências apontam que há uma divergência na literatura em relação a produção de biofilme nos diferentes clados da linhagem ST131, que poderia ser explicada pela evolução de alguns clados associada ao ganho e perda de fatores genéticos específicos.

A presença de três genes que codificam FV relacionados às amostras produtoras de biofilme foi evidenciada no presente estudo. Os genes *hly* (22%, $p=0,05$), *sfa/focDE* (11%, $p=0,03$) e *papG III* (10%, $p=0,04$) foram mais frequentes em amostras produtoras de biofilme em comparação às amostras não produtoras. Dados da literatura reforçam esses achados. Por exemplo, em um estudo, realizado em dois hospitais na França em 2016, que analisou 394 amostras de *E. coli*, sendo 293 isoladas de urina, 48 de sangue, 12 de bile, 7 de fluido ascético, 8 de abscesso e 26 de outras fontes não descritas, foi observado que os genes *sfa/focDE* (61%) e *hlyA* (47%) foram os mais frequentes das 33 amostras produtoras de biofilme forte. A fonte de isolamento não foi associada ao biofilme (Flament-Simon et al., 2019). De forma semelhante, outros estudos identificaram a prevalência desses genes. O gene *sfa/focDE* foi identificado em 56% das amostras produtoras de biofilme em um estudo que incluiu 100 amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com ITU, incluindo 49 pacientes hospitalizados em diferentes unidades de Hospital no Irã e 51 pacientes ambulatoriais (Naziri et al., 2021).

Em 2015, Fattahi e colaboradores, no Irã, analisaram uma coleção de 100 amostras de *E. coli* provenientes de infecções urinárias em pacientes hospitalizados. O gene *pap* em 100% das amostras que produziram biofilme. Esses genes têm sido associados à produção de biofilme forte em amostras que expressam características de aderência, que auxiliam na colonização e invasão, auxiliando no escape ao sistema imunológico do hospedeiro (Ebrahimi et al., 2023).

O alelo I do gene *papG* foi o único não detectado nas amostras da presente coleção. Alguns estudos indicam uma baixa frequência desse gene. Por exemplo, um estudo realizado em Portugal relatou a detecção do *papG* alelo I em apenas duas (6%) amostras de humanos e uma (5%) amostra de gato (Féria et al., 2001). Além

disso, Golpasand e cols. registraram a presença desse gene em apenas três (3%) amostras (Golpasand *et al.*, 2024). Clinicamente, o alelo *papG* de classe II está associado principalmente à pielonefrite e bacteremia humanas, e o alelo *papG* de classe III está associado à cistite humana e a infecções genitourinárias em cães e gatos. Devido à raridade do alelo de classe I, pouco se sabe sobre sua associação clínica (Lane e Mobley, 2007).

Um estudo conduzido em quatro hospitais na Espanha entre os anos de 2016 e 2017, analisou 376 cepas de *E. coli*, das quais 132 amostras foram isoladas de sangue, 60 de secreções respiratórias e 184 de urina. Com o objetivo de caracterizar essas cepas em relação à produção de biofilme, resistência antimicrobiana, perfil de virulência e classificação filogenética, identificou uma associação estatisticamente significativa entre a produção de biofilme e a presença dos genes *papA* (43,1%, $p < 0,001$) e *cnf1* (25%, $p < 0,001$) (Ballén *et al.*, 2022). No presente estudo não foram encontradas associações significativas entre a presença desses genes — *papA* (27%, $p = 0,3$) e *cnf1* (19%, $p = 0,09$) — e a produção de biofilme. A discrepância nesses resultados pode ser explicada pelas variações nas condições ambientais, diferenças nas populações bacterianas estudadas ou outros fatores epidemiológicos que influenciam a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilme (Tiba *et al.*, 2008).

No presente estudo, as frequências de amostras produtoras de ESBL e de amostras com fenótipo MDR foram semelhantes entre os grupos produtores e não produtores de biofilme. Em contraste, um estudo realizado no Nepal com 86 (54%) amostras produtoras de biofilme revelou que, entre aquelas que eram UPEC produtoras de ESBL, 19% apresentaram biofilme forte, 17% biofilme moderado e 24% biofilme fraco (Shrestha *et al.*, 2019).

Outros estudos identificaram uma associação significativa entre a formação de biofilme e a resistência a múltiplos fármacos em cepas de UPEC. Em um estudo conduzido na cidade de Isfahan (Irã), com 265 amostras isoladas de infecção urinária, a frequência do fenótipo MDR foi consideravelmente maior entre as cepas de UPEC produtoras de biofilme forte em comparação às cepas com produção de biofilme fraco (Qasemi *et al.*, 2022).

A descoberta da associação entre produção de biofilme e resistência a antimicrobianos é respaldada pela compreensão de que a estrutura específica do biofilme, particularmente sua matriz extracelular densa e compacta em torno das células bacterianas, não só protege as células contra agentes antimicrobianos, como também facilita a troca de genes de resistência entre elas. (Qasemi *et al.*, 2022). Além da limitada penetração dos antimicrobianos no biofilme e da transferência horizontal de genes, outros fatores que explicam sua resistência incluem a presença de enzimas modificadoras de antibióticos na matriz extracelular, o eDNA, hipóxia, crescimento celular reduzido, variabilidade fisiológica, estresse oxidativo, respostas à privação de aminoácidos, bombas de efluxo, *quorum sensing*, alta taxa de mutação e a formação de variantes de colônia (Rather *et al.*, 2021). Esses mecanismos complexos tornam o tratamento de infecções associadas a biofilmes desafiador, dificultando a erradicação completa das bactérias e a obtenção de resultados terapêuticos eficazes. Infelizmente, não observamos associação da produção de biofilme com resistência a antimicrobianos nas amostras do presente estudo. É possível que o armazenamento em temperatura a -20°C e algumas passagens nos meios de cultura tenha tido impacto nos resultados tanto de resistência a antimicrobianos quanto da produção de biofilme.

Uma limitação do presente estudo foi o pequeno número amostral que limitou as possíveis relações entre a produção de biofilme e certos fatores envolvidos. Seria

igualmente interessante comparar a produção de biofilme em cepas do ST131 e de outros STs; a extensão das análises que realizamos para cepas de outros ST está em discussão. Além disso, a realização de ensaios adicionais de adesão e invasão poderia estabelecer fundamentos para uma associação mais precisa entre os FV investigados e a formação de biofilme. Tais análises estão sendo planejadas em outros estudos do mesmo grupo de pesquisa.

O presente estudo destaca a importância de investigar os fatores associados à produção de biofilme na linhagem ST131, dada sua elevada capacidade de causar diversas infecções, seu potencial de disseminação e sua resistência aos antimicrobianos. Ademais, no Brasil, poucos estudos têm abordado de forma abrangente a produção de biofilme em correlação com características genotípicas e fenotípicas de virulência e resistência nessa linhagem, evidenciando a necessidade de mais pesquisas para elucidar os mecanismos envolvidos na patogenicidade dessa linhagem.

8 CONCLUSÕES

As amostras de UPEC da linhagem ST131 avaliadas no presente estudo apresentaram capacidade considerável de produção de biofilme (73; 64%), sendo em sua maioria produtora de biofilme forte 44 (60%), o que evidencia a importância clínica desse mecanismo na patogenicidade deste microrganismo.

Em comparação com os outros subclados, C1 concentra a maior parte das amostras produtoras de biofilme (26; 81%).

Dos genes de virulência pesquisados, *sfa/focDE*, *papG III* e *hly* foram mais frequentes em amostras produtoras de biofilme em comparação às amostras não produtoras.

Não foram observadas diferenças na frequência de amostras ESBL e MDR entre amostras produtoras e não produtoras de biofilme.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams-Sapper, S. *et al.* Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 490–497, Jan. 2013.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J. e Osheroff, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, v. 53, p. 1565–1574, 2014.
- Alekshun, M. N.; Levy, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–1050, 23 Mar. 2007.
- Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, May 1980.
- Arruda, *et al.* Bibliographic review of Beta-lactam antibiotics. **Health in focus magazine**, v. 11, 2019.
- Babic, M., AM Hujer e RA Bonomo. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist Updat.** v. 9, n. 3, p. 142-156, Jun, 2006.
- Bauckman, Kyle A. *et al.* Dietary restriction of iron availability attenuates UPEC pathogenesis in a mouse model of urinary tract infection. **American journal of physiology. Renal physiology.** v. 316, n. 5, p. F814-F822, May. 2019.
- Beloin C, *et al.* The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** v. 188, n. 4, p 1316-1331, Feb, 2006.
- Ballén, V. *et al.* Correlation Between Antimicrobial Resistance, Virulence Determinants and Biofilm Formation Ability Among Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated in Catalonia, Spain. **Front Microbiol**, v. 12, n. 11. Jan. 2022.

- Blum, S. E. *et al.* Postgenomics Characterization of an Essential Genetic Determinant of Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. **mBio**, v. 9, n. 2, p. e00423-18, 2018.
- Bower, J. M.; Eto, D. S.; Mulvey, M. A. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 6, n. 1, p. 18–31, Jan. 2005.
- Bradford, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933–951, table of contents, Oct. 2001.
- Brumbaugh, AR, Smith, SN, Mobley, HL. Immunization with the Yersiniabactin Receptor, FyuA, Protects against Pyelonephritis in a Murine Model of Urinary Tract Infection. **Infect Immun**, v. 81, n. 9, p. 3309–3316, Sep. 2013.
- Bush, K., Bradford, P. A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 8, p. 341-82, Aug, 2016.
- Bush, K, Jacoby, G. A, Medeiros, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, Jun. 1995.
- Bush, K; Jacoby, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, Mar. 2010.
- Bunduki, G.K., Heinz, E., Phiri, V.S. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 753. Aug. 2021.
- Castanheira, M, J Simner, P, Bradford P. A. β -lactamases: a update on their features, epidemiology and detect. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 3, Sept. 2021.

Concia, E, Bragantini, D, Mazzaferri, F. Clinical evaluation of guidelines and therapeutic approaches in multi drug-resistant urinary tract infections. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 1, p. 19–28, Dec. 2017.

Coque, T. M. *et al.* Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 195–200, Feb. 2008.

Correia, S. *et al.* Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, p. 551–559, 2017.

Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **J Infect.** v. 71, n. 6, p. 615-26. Dec. 2015.

Danese, P.N., Pratt, L.A, Dove S.L., Kolter, R. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms, **Mol. Microbiol**, v. 37, p. 424–432, 2002.

Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.74 n. 3, p. 417-33, Sep. 2010.

Davis, J, Jon M *et al.* Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. **Infection and immunity**, v.73, n. 9, p. 5301-10. 2005.

Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. e Gordon, D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 37-54, Ago. 2020.

De Souza Da-Silva, A. P. *et al.* Prevalence of fluoroquinolone-resistant and broad-spectrum cephalosporin-resistant community-acquired urinary tract infections in Rio de Janeiro: Impact of *Escherichia coli* genotypes ST69 and ST131. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, Nov, 2020.

Dhakal, K; Mulvey, A. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 1, p. 58-59. Jan, 2012.

Doumith M, *et al.* Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. **J Clin Microbiol**, v. 53, n.1, p. 160 –166. 2015.

Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology. Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, Jan. 2010.

Drekonja DM, Johnson JR. Urinary tract infections. **Prim Care**. v. 35, n. 2, P. 345-367. Jun. 2008.

Dumaru, R. *et al.* Study of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of gram-negative Bacilli among the clinical isolates at BPKIHS, Dharan. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 38, 2019.

Ebrahimi, M. T. *et al.* Investigation of the biofilm formation in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* ST131 strains and its correlation with the presence of *fimH*, *afa*, and *kpsMSTII* genes. **Journal of Applied Genetics**, v. 64, n. 2, p. 367-373. May. 2023.

Enright, M.C. Spratt, G.B. Multilocus sequence typing. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 12, Dec 1999.

Eto DS, *et al.* Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1–Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 7, p. e100. Jun. 2007.

Fattahi, S. *et al.* Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran. **GMS Hyg Infect Control**, v. 10. Jul. 2015.

Feng *et al.*, Effect of sub-minimal inhibitory concentration ceftazidime on the pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 15, p. 1047485. Feb 2021.

Flament-Simon, S. C. *et al.* Association Between Kinetics of Early Biofilm Formation and Clonal Lineage in *Escherichia coli*. **Front Microbiol**, v. 10. May. 2019.

Flores- Mireles, A. L. *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, May 2015.

Foxman, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infectious disease clinics of North America**, v. 28, n. 1, p. 1-13. Dec. 2013.

Garenaux, A., Caza, M., & Dozois, CM. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 89–98. Jun. 2011.

Gibreel, T. M. *et al.* Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 346–356, Feb. 2012.

Golpasand, T. *et al.* Distribution of chaperone-usher fimbriae and curli fimbriae among uropathogenic *Escherichia coli*. **BMC Microbiol**, v. 1, n. 24. Sep. 2024.

Green, Erin R e Joan Mecsas. Bacterial Secretion Systems: An Overview. **Microbiol Spectr**, vol. 4, n. 1. Feb. 2016.

Guyer, D. M. *et al.* Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 53–66, Oct. 2000.

Heimer, R. *et al.* Autotransporter Genes *pic* and *tsh* Are Associated with *Escherichia coli* Strains That Cause Acute Pyelonephritis and Are Expressed during Urinary Tract Infection. **Infect Immun.** v. 72, n. 1, p. 593-597, Jan, 2004.

Henriques, A. *et al.* Why Biofilms are important in nosocomial infections - the state of the art. **Medicine Archives**, v. 1, n. 27, p. 27-36, 2013.

Hooton, T. M. Uncomplicated urinary tract infection. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 11, p. 1028-1037. 2012.

Ito, Y. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm effects of abietic acid on cariogenic *Streptococcus mutans*. **Odontology**, v. 108, n. 1, p. 57–65, Jan, 2020.

Ørskov, I., & Ørskov, F. *Escherichia coli* in Extra-Intestinal Infections. **The Journal of Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551–575. 1985.

Jadhav, S. *et al.* Virulence Characteristics and Genetic Affinities of Multiple Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* from a Semi Urban Locality in India. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e18063, Mar. 2011.

Jahandeh, Nadia *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes. **Central European journal of urology**, v. 68, n. 4, p. 452, 2015.

Jamal, M. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc**, v. 1, n. 81, p. 7-11, Jan. 2018.

Garnett, J. e Steve Matthews. Interactions in the development of bacterial biofilms: a structural perspective. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, p, 739-755. 2012.

Johnson, J.R, *et al.* *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 3, p. 286-294. Aug. 2010.

Johnson, J. R. Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 80-128, Jan. 1991.

Johnson, J. R. *et al.* *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug resistant *E. coli* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 3, p. 286–294, Aug. 2010.

Johnson, J. and Stell, A. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261-272, Jan. 2000.

Johnson J. R. *et al.* Intensity and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance within the H30 and H30Rx Subclones of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Compared with Other Fluoroquinolone-Resistant *E. coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, Aug. 2015.

Johnson, J. R. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, vol.17, no. 2, p.261-278, Jun, 2003.

Johnson JR, *et al.* Clonal Relationships and Extended Virulence Genotypes among *Escherichia coli* Isolates from Women with a First or Recurrent Episode of Cystitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 10, p. 1508–1517. May. 2001.

Kaper J.B., Nataro J.P. & Mobley H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, Feb. 2004.

Kataoka K. The intestinal microbiota and its role in human health and disease. **J Med Invest**, v. 63, p. 27-37, Feb, 2016.

Kolman K.B. Cystitis and Pyelonephritis Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 46, n. 2, p. 191-202. Jun 2019.

Król, E. *et al.* Genome rearrangements induce biofilm formation in *Escherichia coli* C – an old model organism with a new application in biofilm research. **BMC Genomics**, v. 20, n. 767, 2019.

Lane, M. e Mobley, H. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. **Kidney Int**, v. 1, n. 72, p. 19-25. Jul. 2007.

Lasa, I. *et al.* Bacterial biofilms and infection. **An Sist Sanit Navar**, v. 2, n. 28, p. 163-75, May. 2005.

Lichtenberger, P., Hooton, TM, Complicated urinary tract infections. **Curr Infect Dis Rep**, v. 10, n. 6, p. 499-504, Nov, 2008.

Liu B, Pop M. ARDB - Antibiotic Resistance Genes Database. **Nucleic Acids Res.** V. 37, n. 1, p. D443-D447. Jan, 2009.

Longo, D. L. *et al.* Urinary Tract Infections, Pyelonephritis, and Prostatitis. **Harrison's Principles of Internal Medicine.** v. 18, 2012.

Lüthje, P. & Brauner, A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. **Advances in Microbial Physiology**, v. 65, p. 337–372, Nov. 2014.

MacPherson DW. *et al.* Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 11, p. 1727-32, 2009.

Maiden, M. C. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140–3145, Mar. 1998.

Magiorakos, A. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n.3 p. 268-81, Jul. 2011.

Mann, R. *et al.* Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 241, Jun. 2017.

Maroncle NM, *et al.* Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p 6124-34, Nov, 2006.

Mathai D, Jones RN, Pfaller MA; SENTRY Participant Group North America. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 40, n, 3, p. 129-136, Jul 2001.

Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 3, p. 565-591, Jul 2015.

Matsumura, Y, *et al.* Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4736-4742, 2013.

Matsumura Y, *et al.* Rapid identification of different *Escherichia coli* sequence type 131 clades. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61. 2017.

Phan *et al.*, Plasmid-Mediated Ciprofloxacin Resistance Imparts a Selective Advantage on *Escherichia coli* ST131. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 1, 2022.

Mirzahosseini HK *et al.* Correlation of biofilm formation, virulence factors, and phylogenetic groups among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection: A

global systematic review and meta-analysis. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 28. 2023.

Moellering, R. C. Urinary Tract Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, vol. 11, no 3, sept., 1997.

Moreno, E. *et al.* 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**, v. 53, n. 2, p. 93–99, Oct. 2005.

Morrison I e Zembower T. Antimicrobial Resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 619-635, Oct. 2020.

Munita, M. e Arias, A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectrum**, v. 4, n. 2, Apr, 2016.

Nataro, J P, and J B Kaper. “Diarrheagenic *Escherichia coli*.” **Clinical microbiology reviews**. v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

Naziri Z. *et al.* Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*: a complicating factor for treatment and recurrence of urinary tract infections. **J Hosp Infect**, v. 117, p. 9-16. Nov. 2021.

Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X. & Madec, J. Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 543-574, 2014.

Nicolas-Chanoine, *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25: H4-ST131 producing CTX-M-15. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 273-281, 2008.

Nicolle, L. E. Complicated pyelonephritis: unresolved issues. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, n. 6, p. 501-507, 2007.

- Nuutinen M, Uhari M. Recurrence and follow-up after urinary tract infection under the age of 1 year. **Pediatr Nephrol**, v. 16, n. 1, p. 69-72, Jan 2001.
- Parvez, A. S. e Rahman, D. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli*. **Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factors**, p. 7-21, 2018.
- Pitout, J. D. e DeVinney, R. *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. **F1000Research**, v. 6, p. 1-7, 2017.
- Pratt, L. A e Kolter, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 2, p. 258-93, Oct, 1998.
- Qasemi, A. *et al.* Clonal groups of extended-spectrum β -lactamase and biofilm producing uropathogenic *Escherichia coli* in Iran. **Pathogens and Global Health**, v. 116, n. 8, p. 485-497, 2022.
- Rather, M. *et al.* Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1701-1718, 2021.
- Raynor, M. C.; Carson, C. C. Urinary Infections in Men. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 1, p. 43–54, Jan. 2011.
- Riley, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 380–390, May 2014.
- Rippere-Lampe KE, O'Brien AD, Conran R, Lockman HA. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf1) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**. v. 69, n. 6, p. 3954-64, Jun, 2001.
- Houdt. R. Chris W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 6, p. 626-633, Jun 2005.

- Robicsek, A. *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, v. 12, p. 83–88, 2006.
- Rupp, M.E., Fey, P.D. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Enterobacteriaceae*. **Drugs**, v. 63, p. 353–365, 2003.
- Russo TA, Johnson JR. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.
- Shah, C *et al.* Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiol**, v. 19, n. 1, Sep 2019.
- Sheldon, I. M. *et al.* Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. **Plos One**, v. 5, 2010.
- Shrestha, R. *et al.* Extended spectrum β -lactamase producing uropathogenic *Escherichia coli* and the correlation of biofilm with antibiotics resistance in Nepal. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 18, n. 42, 2019.
- Slavchev, G.; Pisareva, E.; Markova, N. Virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of culture collections**. v. 6, p. 3-9, 2009.
- Smelov *et al.*, Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. **European Association of Urology**, v.15, n. 4, p. 71-80, 2016.
- Snyder, A *et al.* Coordinate Expression of Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 73, p. 7588-7596. Nov 2005.
- Soto, S. M. *et al.* Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. **J Urol**, v. 177, n. 1, p. 365-368. Jan. 2007.

- Stromberg, Z. R. *et al.* Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. **Plos One**, v. 12, 2017.
- Subashchandrabose, S. e Mobley, H. L. T. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, Aug. 2015.
- Sultan *et al.* Quinolone-resistant uropathogenic *E. coli*: is there a relation between qnr genes, gyrA gene target site mutation and biofilm formation? **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, 2021.
- Tandogdu, Zafer and Florian M. E. Wagenlehner. Global epidemiology of urinary tract infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, p. 73–79. 2016.
- Tartof, S. Y. *et al.* Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5860–5864, Dec. 2005.
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G. e Maffei, M. E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- Tiba, M. R. *et al.* Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli* strains isolated from patients with cystitis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 1, n. 42, p. 58-62, Jan. 2009.
- Vetting MW, *et al.* Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional variant AAC(6')-Ib-cr active with fluoroquinolone. **Biochemistry**, v. 47, p. 9825-9835, 2008.
- Wiles, T. J. e Mulvey, M. A. The RTX pore-forming toxin α -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. **Future Microbiology**, v. 8, p. 73–84, 2013.

Wirth, T. *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, p. 1136–1151, 2006.

Wu Y, Outten FW. IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. **J Bacteriol**, v. 191, n. 4, p. 1248-57. Feb 2008.

Zhang, S. *et al.* Epidemic Potential of *Escherichia coli* O16:H41-ST131: Compared with Pandemic O25b:H30-ST131 Lineage. **Infect Drug Resist**, v. 8, n. 14, p. 2625-2632, Jul. 2021.

Zhao, F. *et al.* A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, 2020.

10 ANEXO

Tabela A1 valores de densidade óptica para cada amostra

Amostra	DO	Biofilme	Clado
88	0.112	N	
119	0.022	N	
177	0.453	N	
219	1.410	Forte	
273	0.476	Fraco	
289	1.105	Forte	
325	3.183	Forte	
326	0.283	N	
419	0.393	N	
498	0.672	Fraco	A
606	0.297	N	
621	0.248	N	
647	0.970	Fraco	
650	0.323	N	
826	1.563	Forte	
860	0.195	N	
924	2.265	Forte	
975	1.119	Forte	
976	0.180	Fraco	
8	0.263	N	
52	2.239	Forte	
105	1.985	Forte	
106	2.529	Forte	
124	2.947	Forte	
133	0.089	N	
142	2.007	Forte	
237	0.608	Fraco	
257	0.850	Fraco	
270	0.351	N	
283	1.883	Forte	B
373	1.247	Forte	
491	0.312	N	
550	2.213	Forte	
623	0.455	N	
634	0.341	N	
725	0.520	Fraco	
763	0.262	N	
770	0.881	Fraco	
842	1.710	Forte	
968	1.831	Forte	
985	0.346	N	

DO: densidade óptica; N: negativo

Tabela A2 valores de densidade óptica para cada amostra

Amostra	DO	Biofilme	Clado
1	2.611	Forte	
6	0.630	fraco	
9	2.647	Forte	
34	0.674	Fraco	
57	2.514	Forte	
84	0.555	Fraco	
125	0.329	N	
242	0.777	Fraco	
247	0.215	N	
285	0.299	N	
297	3.365	Forte	
368	1.622	Forte	
393	0.366	N	
395	0.976	Fraco	
442	0.921	Fraco	
500	1.066	Forte	
515	0.728	Fraco	C1
583	2.636	Forte	
600	0.876	Fraco	
701	1.766	Forte	
706	0.841	Fraco	
791	1.225	Forte	
799	0.681	Fraco	
819	2.550	Forte	
820	0.383	N	
833	2.045	Forte	
868	1.317	Forte	
911	1.251	Forte	
929	2.278	Forte	
971	0.783	Fraco	
991	0.131	N	
995	0.906	Fraco	
123	1.028	Forte	
330	0.737	fraco	
414	1.421	Forte	
735	1.002	Forte	C1-M-27
754	0.373	N	
887	0.369	N	
928	0.297	N	

DO: densidade óptica; N: negativo

Tabela A3 valores de densidade óptica para cada amostra

Amostra	DO	Biofilme	Clado
37	1.234	Forte	
40	0.436	N	
131	0.255	N	
183	1.583	Forte	
208	0.894	Fraco	
223	0.342	N	
272	-0.094	N	
291	0.278	N	
301	0.803	Fraco	
328	1.728	Forte	
377	2.443	Forte	
434	-0.061	N	
439	0.214	N	
470	0.944	Fraco	
478	0.459	N	
505	0.010	N	
507	1.776	Forte	C2
522	0.628	Fraco	
577	0.408	N	
636	0.643	Fraco	
640	0.859	Fraco	
708	0.520	Fraco	
728	1.239	Forte	
738	-0.019	N	
739	0.151	N	
741	1.025	Forte	
749	0.180	N	
769	1.047	Forte	
858	1.069	Forte	
870	1.216	Forte	
881	2.953	Forte	
920	0.093	N	
953	-0.042	N	
402	0.499	Fraco	C

DO: densidade óptica; N: negativo

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO / HUCFF-
UFRJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS PANDÊMICAS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS ISOLADAS NO RIO DE JANEIRO

Pesquisador: Beatriz Meurer Moreira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59953322.9.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.557.536

Apresentação do Projeto:

Protocolo CEP n 084/22.

Trata-se de uma pesquisa tipificada como A1 e A3.

As informações colocadas nos campos denominados "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo intitulado

"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1958551.pdf", postado em 07/06/2022 e "Projeto_Pesquisa.pdf", de 06/06/2022.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 02 de Agosto de 2022

Assinado por:
Marta Guimarães Cavalcanti
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255, 7º andar, Ala E, sala 35
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br