

ULYSSES MORAES DE OLIVEIRA

**CISTITE: FATORES DE VIRULÊNCIA DA
Escherichia coli EM SUA PATOGÊNESE**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina
- Área de Medicina Interna da Faculdade de Ciências Mé-
dicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Doutor em Medicina.

Orientador: Prof.Dr.Tomomasa Yano

Campinas - 1995



Cam.00076470-8

UNIDADE	JRC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	OL4C
	125446
PROD.	933/95
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	19/09/95
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Oliveira, Ulysses Moraes
OL4C Cistite : Fatores de virulência da *E.coli* em sua patogênese /
Ulysses Moraes de Oliveira. - - Campinas, SP : [s.n.], 1995.

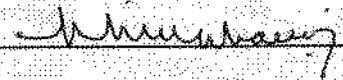
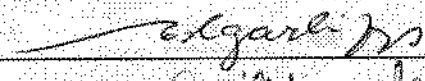
Orientador: Tomomasa Yano
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Trato urinário. 2. Cistite. 3. Escherichia coli.
4. Virulência. 5. Relações hospedeiro-parasita. Iyano,
Tomomasa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof.Dr.Tomomasa Yano

Membros:

1. Prof. Dr. Roberto Múcio Yanagita 
2. Prof. Dr. Sebastião Lima Yano 
3. Prof. Dr.º Celso Rígido Grepp 
4. Prof. Dr.ª Maria Almeida V. R. Reis 
5. Prof. Dr. Tomomasa Yano 

Curso de pós-graduação em Medicina, área de Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/06/95

DEDICATÓRIA

Aos entes queridos que sempre me incentivaram

Ulysses

Victalina

Maria Cecilia

Ulysses

Juliana

Carolina

AGRADECIMENTOS

- 1- Ao Prof. Dr. TOMOMASA YANO, pela valiosa orientação, pelo convívio amigo e pela maneira peculiar de microbiologista, ao enfatizar a visão biológica da interpretação dos resultados, sob a ótica da relação parasita-hospedeiro.
- 2- Ao Prof. Dr. JORGE BLANCO, titular em microbiologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Veterinária de Lugo, da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha, pela realização da sorotipagem das amostras de *E.coli*.
- 3- Aos amigos, colegas de trabalho do Laboratório de Microbiologia Clínica do HC-UNICAMP, pela ajuda na realização de algumas provas.
- 4- Aos amigos do Laboratório de Antígenos Bacterianos, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.
- 5- Ao Engenheiro Marinho Gomes de Andrade Filho, pela análise estatística.
- 6- A amiga Maria Viviane Veras Costa Pinto pela colaboração na correção do texto.
- 7- Ao Dr. Antonio Ricardo Amarante pelo auxílio nas discussões estatísticas.
- 8- Ao Serviço de Apoio Didático da F.C.M., pela inestimável colaboração.

RESUMO

Estudamos 159 pacientes do sexo feminino, em diferentes faixas etárias, que apresentavam sinais e sintomas de cistite. Correlacionamos a resposta mucosa local com os fatores de virulência das cepas de *Escherichia coli* isoladas da urina destas pacientes. A bacteriúria foi comprovada em todas as pacientes e laboratorialmente observamos três tipos de resposta: presença de leucocitúria (BL), presença de leucocitúria e hematúria (BLH) e ausência de leucocitúria (B). Pesquisamos, nas *E.coli*, a expressão das fimbrias tipo 1, P, S, da hemaglutinina Dr e a produção das citotoxinas: hemolisina (Hly) e fator necrosante citotóxico (CNF1). Obtivemos os seguintes resultados: a fimbria S não foi detectada e a hemaglutinina Dr foi expressa por somente 3 cepas das 21 pesquisadas. A fimbria tipo 1 e as duas citotoxinas não se correlacionaram com a resposta mucosa local. As cepas que expressaram fimbria P, foram mais freqüentes nas pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos e relacionam-se com aquelas que evoluíram com leucocitúria (BL e BLH). A ausência de resposta mucosa local prevaleceu nas pacientes mais idosas. Detectamos uma dependência direta ou inversa entre a expressão ou produção de alguns fatores de virulência, ou seja, a presença de um fator implica a presença ou ausência do outro. Essa dependência variou com a idade da paciente, fato que permitiu definir, somente nas pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos, o fenótipo: fimbria tipo 1⁺, Hly⁺, CNF1⁺ e FP⁻. As cepas FP⁺ apresentaram dependência inversa com tipo 1⁻. Detectamos também, que nas cepas Hly⁺, 63,8% são CNF1⁺, e que naquelas CNF1⁺, 90,24% são Hly⁺. Dentre as cepas FP⁺, 50% foram hemolíticas. O sorogrupo O6 foi o mais freqüente enquanto que 83,3% das cepas FP⁺, pertenciam a um dos 8 sorogrupos de maior prevalência nas ITU, dentre os quais o mais freqüente foi O7.

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO.....	01
1. Aspectos clínicos.....	01
2. Patogênese da infecção do trato urinário.....	03
2.1. Uropatógenos.....	03
2.2. Vias de infecção.....	04
3. <i>Escherichia coli</i> - seus fatores de virulência.....	05
3.1. Adesinas relacionadas à ITU.....	05
3.1.1. Fímbria P.....	10
3.1.2. Fímbria S.....	12
3.1.3. Hemaglutininas Dr.....	12
3.1.4. Fímbria tipo 1.....	13
3.1.5. Fímbria tipo 1 C.....	14
3.2. Toxinas.....	15
3.2.1. Alfa hemolisina (Hly).....	15
3.2.2. Fatores necrosantes citotóxicos (CNF1 e CNF2).....	16
3.3. Antígenos O e K (sorotipos O:K:H).....	18
3.4. Resistência ao soro e à fagocitose.....	20
3.5. Aerobactina.....	21
4. Aspectos da relação parasita/hospedeiro.....	22
4.1. A adaptação, "in vivo", dos fatores de virulência.....	25
II- OBJETIVOS.....	27

III- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	28
1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
1.1. Pacientes.....	28
1.1.1. Caracterização da cistite.....	28
1.1.2. Classificação das pacientes quanto a resposta mucosa local.....	28
1.1.3. Classificação das pacientes segundo a idade.....	29
2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	29
2.1. Coleta da urina.....	29
2.2. Urocultura.....	30
2.3. Identificação das cepas de <i>E.coli</i>	30
2.4. Quantificação dos leucócitos e hemácias na urina.....	31
2.5. Detecção da fimbria tipo 1.....	31
2.6. Detecção da fimbria P.....	32
2.7. Detecção da fimbria S.....	33
2.8. Detecção da hemaglutinina Dr.....	33
2.9. Detecção da hemolisina.....	34
2.10. Detecção do fator necrosante citotóxico.....	34
2.10.1. Obtenção de extratos com mitomicina C.....	34
2.10.2. Detecção de toxinas em células VERO e HeLa.....	34
2.11. Sorotipagem: determinação do sorogrupo O.....	35
2.11.1 Preparação das suspensões bacterianas.....	35
2.11.2. Determinação presuntiva do antígeno O.....	35
2.11.3. Confirmação do antígeno O.....	36

2.12. Conservação das cepas.....	36
2.13. Cepas de <i>E.coli</i> de referência.....	36
IV- RESULTADOS.....	37
V- DISCUSSÃO.....	51
VI- CONCLUSÕES.....	61
SUMMARY.....	63
VII- BIBLIOGRAFIA.....	64
ANEXOS.....	81

I - INTRODUÇÃO

1- ASPECTOS CLÍNICOS

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das doenças infecciosas mais frequentes da prática médica, podendo ser comunitária ou hospitalar.

A ITU apresenta um espectro de condições clínicas e patológicas envolvendo várias partes do trato urinário, variando de bacteriúria assintomática a abscesso perinefrético com septicemia. Cada uma apresenta sua própria epidemiologia, história natural e considerações diagnósticas e sua diferenciação tem importantes implicações no tratamento e prognóstico.

De acordo com JOHNSON (1991), ITU significa a presença de microrganismos na bexiga, ureter, sistema coletor ou rins, sendo mais frequentemente causada por bactérias, embora ocasionalmente fungos e vírus possam estar envolvidos.

O termo bacteriúria refere-se à presença da bactéria na urina, como resultado de uma infecção, porém, podemos detectá-la em amostras de urina de micção espontânea, devido à contaminação com bactérias da flora uretral, peri-uretral ou vaginal.

Embora as amostras coletadas por cateterização uretral ou punção suprapúbica possam refletir, com maior exatidão, o estado da urina, esses procedimentos são invasivos e desconfortáveis, fazendo com que o diagnóstico da ITU seja usualmente realizado em amostras de urina coletadas por micção espontânea.

A urocultura é o único exame quantitativo na microbiologia clínica. As condições de coleta, transporte, tempo de estase vesical, medicação e também a colonização do trato urinário inferior podem influenciar na quantificação, não raro falseando o resultado.

Segundo STAMEY (1980), os primeiros pesquisadores a fazerem um exame quantitativo da urina foram KASS et al, em 1956, utilizando a seguinte metodologia de coleta: a) coleta de todo o volume urinário (e não o jato médio); b) limpeza perineal com 4 gazes embebidas em sabonete; c) sabão não removido antes da micção e d) urina mantida refrigerada por uma noite, aguardando o resultado do exame de triagem, para somente então ser semeada a cultura quantitativa. Dessa maneira, estabeleceram que uma única cultura com contagem de colônias igual ou superior a 100.000 bactérias/ ml de urina tinha uma chance de 80% de representar a bacteriúria vesical; duas culturas consecutivas apresentavam um índice

de confiança de 91% e três culturas apresentavam o mesmo limite de confiança obtido com uma única cultura de urina cateterizada, ou seja 95%.

Tendo em vista que a repetição da urocultura não era prática, STAMEY et al (1985), estipularam outra metodologia de coleta, que é realizada atualmente: a) assepsia perineal realizada por pessoal treinado; b) remoção do antisséptico antes da micção; c) coleta do segundo jato urinário (jato médio). Com essa metodologia obtiveram um limite de confiança de 95% (idêntica às 3 coletas consecutivas).

O limite tradicionalmente utilizado para confirmar ITU é a contagem de colônias igual ou superior a 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC)/ml de urina.

Atualmente, a definição de bacteriúria é mais dinâmica, variando na dependência do quadro clínico e do método de coleta. (Tabela 1)

TABELA 1: Critérios para definir bacteriúria significativa.

> 10^2 UFC coliformes/ml ou > 10^5 UFC não coliformes/ml em mulheres sintomáticas.
> 10^3 UFC bactérias/ml em homens sintomático
> 10^5 UFC bactérias/ml em indivíduos assintomáticos em 2 amostras consecutivas
Qualquer crescimento bacteriano em punção supra-púbica em pacientes sintomáticos.
> 10^2 UFC bactérias em pacientes cateterizados

Referência: JOHNSON (1991)

Bacteriúria assintomática refere-se à presença de bacteriúria em pacientes sem sintomas atribuíveis ao trato urinário, ocorrendo mais comumente em grávidas e idosos

Os pacientes com bacteriúria sintomática apresentam bacteriúria na presença de sintomas urinários.

JOHNSON (1991) define cistite como infecção vesical. Os sintomas típicos são causados pela inflamação da bexiga e uretra. A disúria é a principal queixa, dor e ardência podem ocorrer no início, durante e imediatamente após a micção. Outros sintomas

incluem urgência urinária, desconforto suprapúbico e frequência urinária de pequenos volumes. Normalmente cursam sem febre ou outros sintomas sistêmicos. Algumas vezes, o paciente pode notar hematúria ou turvação na urina, e referir dor intensa.

A ITU baixa deve ser diferenciada de outras causas infecciosas e não infecciosas de disúria e polaciúria, como irritação mecânica ou química, alergia, vulvovaginites e uretrites por patógenos de transmissão sexual.

Segundo JOHNSON (1991), a pielonefrite aguda consiste em dor localizada no flanco, ou dor a punho percussão, combinada com sintomas sistêmicos como febre, calafrios e prostração. A pielonefrite aguda é causada por infecção do parênquima renal e sistema coletor, e quase sempre complicada por bacteriemia.

Apesar do tratamento com drogas antimicrobianas, as ITU podem ser recorrentes. A recorrência da bacteriúria com um microrganismo diferente do anteriormente isolado é denominada *reinfeção*, enquanto a recorrência com o mesmo microrganismo é denominada *recidiva*.

2- PATOGÊNESE DA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO.

A localização da ITU, sua propagação pelo trato urinário e a possibilidade de bacteriemia, pode ser determinada pelo tamanho do inóculo bacteriano, pelos fatores de virulência da cepa infectante e pela resistência do hospedeiro.

Esses fatores influenciam também a severidade clínica da infecção. Quando os mecanismos de defesa do hospedeiro estão comprometidos, com a presença de avançada patologia obstrutiva, apenas um pequeno número de bactérias, relativamente avirulentas, pode induzir a uma severa infecção. Ao contrário, na normalidade anatômica e funcional do trato urinário, é essencial um grande inóculo de bactéria virulenta, para ocorrer infecção.

2.1. UROPATÓGENOS

A maioria das ITU são causadas por microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, que geralmente se originam da flora intestinal.

Segundo MEASLEY Jr & LEVINSON (1991) a *Escherichia coli* é o

patógeno urinário mais comum, ocorrendo em 85% das ITU comunitárias. Outras enterobactérias como *Proteus sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* e, também, o *Staphylococcus saprophyticus*, são menos frequentes. Outros patógenos como *Streptococcus* do grupo B, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans* originam-se da flora vaginal, ou da pele do períneo feminino.

2.2. VIAS DE INFECÇÃO

Os microrganismos podem alcançar o trato urinário pela via ascendente, hematogênica ou linfática. Segundo COX et al (1968) e DAIFUKU & STAMM (1984), existem consideráveis evidências clínicas e experimentais de que a via mais comum é a da ascensão pela uretra, a partir da fonte entérica, especialmente *E. coli* e outras Enterobactérias. Essa é a explicação mais lógica para a maior frequência de ITU em mulheres, e para o aumento do risco de infecção após cateterização vesical ou instrumentação.

Segundo HINMAN (1966), BRAN et al (1972), BUCKEY et al (1978) e KELSEY et al (1979), a uretra feminina é sujeita à contaminação (durante a atividade sexual, massagem uretral ou mesmo durante a micção) com a flora intestinal residente no períneo.

STAMEY et al (1968) fazem referência ao fato de que, em homens, a maior extensão da uretra e a propriedade antibacteriana da secreção prostática são barreiras efetivas contra a invasão por essa via.

Os microrganismos vesicais podem ascender pelo ureter, mesmo contra o fluxo urinário, especialmente se facilitados por refluxo vesico-ureteral, e assim alcançarem a pelve renal, penetrando no rim e no sistema coletor.

Clinicamente, a infecção hematogênica do trato urinário é restrita a relativamente poucos uropatógenos incomuns, como *S. aureus*, *Candida sp*, *Salmonella sp*, e *M. tuberculosis*, os quais causam infecção primária em outra parte do organismo. A via linfática de difusão da infecção do trato urinário, ainda permanece especulativa.

3. *Escherichia coli* - SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA

A *Escherichia coli* é uma bactéria, da família *Enterobacteriaceae* que faz parte da microbiota intestinal de mamíferos, caracterizando-se por ser um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, podendo causar infecções intestinais e extra-intestinais.

Fatores de virulência são todas as propriedades do microrganismo, que contribuem para aumentar seu poder patogênico. Os fatores de virulência das *E. coli*, causadoras de ITU, conhecidos, são as adesinas, a produção de toxinas (hemolisina e fator necrosante citotóxico), certos antígenos somáticos O e capsulares K, a resistência à atividade bactericida do soro e à fagocitose e a produção de sideróforos.

3.1 ADESINAS RELACIONADAS À ITU

Numerosas adesinas têm sido caracterizadas nas cepas de *E.coli* associadas a infecções do trato urinário (Tabela 2).

TABELA 2 -Adesinas de *E.coli* associadas à ITU.

Adesina	Características da adesão
Fímbria P	glicolípide específico do grupo sanguíneo P com digalactosídio alfa-D-Gal-(1-4)-beta-D-Gal
Fímbria tipo 1	D-manose em glicoproteínas
Fímbria tipo 1C	desconhecidos detalhes moleculares não hemaglutinante
Adesina O75X	adere ao colágeno tipo IV cloranfenicol inibe adesão
Fímbria	sialil galactosídios Ac.Neu-alfa-(2-3)-Gal em glicoproteínas

Referências: KORHONEN et al (1984), LUND et al (1988) e PARKKINEN et al (1988).

SVANBORG-ÉDEN et al (1976), SVANBORG-ÉDEN (1978), SVANBORG-ÉDEN et al (1978), SVANBORG-ÉDEN & HANSON (1978) e SVANBORG-ÉDEN et al (1983a) comprovaram que as cepas de *E. coli* isoladas de pielonefrite aderiam muito mais freqüentemente a células uroepiteliais humanas, que as cepas isoladas de cistite e que estas aderiam melhor que as cepas procedentes de bacteriúria assintomática e da flora intestinal normal. ORSKOV & ORSKOV (1983a), ORSKOV & ORSKOV (1985) e KORHONEN et al (1988), demonstraram que a aderência às células epiteliais é um fator fundamental, talvez o mais importante, nas infecções do trato urinário e nas urosepses.

ORSKOV & ORSKOV (1983b), KLEMM (1985) e KORHONEN et al (1988) caracterizaram várias adesinas expressas por *E. coli* urinárias, bacteriêmicas e associadas com meningite.(Tabela 3).

TABELA 3 - Características das principais adesinas de *E. coli* causadoras de infecções extra-intestinais *

Adesina	Peso molecular(d)	Diâmetro (nm)	Hemaglutinação	Doença associada
Fimbria P*	18000 22000	5-7	MHMR	pielonefrite
Fimbria S*	15950	5-7	MHMR	meningite e sepse neonatal
Hemaglutinina Dr (O75 X)	14500	2-3	MHMR	
Fimbria tipo 1* (F1A)	17000	5-7	MHMS	muito freqüente patogênicas ou não
Fimbria 1C*	16000	5-7	--	

* Morfologicamente todas são fimbrias

Referências: ORSKOV & ORSKOV (1983a) e KORHONEN et al (1988).

As adesinas diferem em sua especificidade de união a receptores de células epiteliais de composições químicas diferentes, em suas propriedades hemaglutinantes, em suas propriedades sorológicas, em sua codificação genética e, também, em seu aspecto morfológico.

GAASTRA & GRAAF (1982), ORSKOV & ORSKOV (1983b) e KLEMM (1985) descreveram que a maioria das adesinas são apêndices filamentosos, retilíneos, de uns 7 nm de diâmetro e de 0,2 a 2 µm de comprimento, que se irradiam em forma peritríquia a partir da superfície celular, em número de 100 a 1000 por célula e que recebem o nome de fimbria. Estas são constituídas por cerca de 1000 subunidades protéicas idênticas.

As expressas por *E. coli* extra-intestinais são todas codificadas em genes cromossômicos.

As adesinas também têm sido observadas, tanto em apêndices flexíveis de 2 a 3 nm de diâmetro, de natureza proteica, denominadas fibrilas tendo sido descritas por KIM et al (1990) e NOWICKI et al (1990), como também na superfície de cápsulas proteicas, segundo trabalhos de HARBER (1985), GRÜNBERG et al (1988) e HOSCHÜTZKY et al (1989).

Baseando-se em sua propriedade hemaglutinante, as adesinas de *E. coli* podem ser classificadas em 3 grupos:

- a) adesina com hemaglutinação manose sensível (HMS);
- b) adesina com capacidade hemaglutinante resistente a manose(HMR);
- c) adesina não hemaglutinante

DUGUID et al (1979) e EVANS Jr. et al (1979), (1980a),(1980b) e (1981), classificaram as cepas de *E. coli* em diferentes tipos e padrões de hemaglutinação, frente a eritrócitos de várias espécies.

De acordo com BRINTON Jr (1965), DUGUID et al (1979) e ORSKOV & ORSKOV (1983b), a hemaglutinação manose sensível(HMS) é devida à fimbria tipo 1, presente em amostras patogênicas e não patogênicas de *E. coli*. ORSKOV & ORSKOV (1985) e KORHONEN et al (1988), preconizaram que existem argumentos a favor e contra o papel da fimbria tipo 1 na patogênese da *E. coli*, mas, em geral, considera-se que não é um fator de virulência.

A adesão das *E. coli* uropatogênicas às células do uroepitélio humano é resistente à manose, de acordo com SVANBORG-ÉDEN & HANSON (1978), GONZÁLES & BLANCO (1987) e KÄLLENIUS & MÖLLBY (1979) fizeram a correlação com a capacidade de aglutinar eritrócitos humanos na presença de D-manose.

Uma dificuldade no estudo das adesinas é, segundo ORSKOV & ORSKOV (1983b), KORHONEN et al (1988) e de REE & van den BOSCH (1989), que muitas cepas podem expressar vários tipos (2 ou 3) de diferentes adesinas, incluindo-se também algumas variedades (1 a 3) de fimbrias P.

Além disso, existe um fator complicador que é o fenômeno de variação de fase presente em quase todas as adesinas e que pode ocorrer tanto "in vitro", como "in vivo", durante infecções sistêmicas em camundongos (NOWICKI et al 1986) e em infecções do trato urinário em humanos (PERE et al 1987). Segundo EISENSTEIN (1981) e KISIELIUS et al (1989), este fenômeno consiste em que, dependendo das condições ambientais, as bactérias podem expressar um ou outro tipo de adesina, ou simplesmente não expressar nenhum tipo de fator de colonização.

KORHONEN et al (1988), trabalhando com técnicas de imunofluorescência direta e indireta e utilizando cepas controles, que expressavam somente um tipo de fimbria, localizou os receptores celulares das diferentes adesinas de *E. coli* por todo o trato urinário, assim como alguns inibidores da adesão, presentes na urina humana (Tabela 4).

TABELA 4 - Adesão das fimbrias e adesinas de *E.coli* ao rim e bexiga humanos, às células do sedimento e aos inibidores presentes na urina humana normal.

Tecido	Adesina				
	fimbria	fimbria	fimbria	fimbria	adesina
	P	S	tipo 1	tipo 1C	O75X
Rim					
cápsula de					
Bowman	+++	+++	-	-	+++
Glomérulo	+++	+++	-	-	-
Túbulo prox	++	++	+++	-	+++
Túbulo distal	++	++	(+)	++	+++
Coletor	+	++	(+)	++	+++
Endotélio	+++	+++	+++	+++	-
Bexiga					
Epitélio	+	++	-	-	+
Endotélio	+++	+++	++	+++	-
Muscular	+	+	+++	+	+
Tec.conjunt.	-	++	-	-	+++
Células do sedimento	+	+	-	-	+
Inibidores na Urina*					
Oligossacarídeos	-	-	+	nd	+/-
TH glicoproteína	-	+	(+)	-	-

nd= não determinado TH=Tamm-Horsfall
Referência: KORHONEN et al (1990)
adesão tecidual graduada em +++ (intensa) a - (não detectável); (+) adesão muito fraca
*+ intensa interação, (+) pequena interação, - ausência de interação

Com esses resultados, KORHONEN et al (1981), KORHONEN et al (1988) e PARKKINEN et al (1988) chegaram à conclusão de que as diferentes adesinas de *E. coli* apresentavam um marcante tropismo pelos diferentes tecidos do trato urinário. Elas se ligam, diferente e seletivamente, a restritos locais do tecido e várias superfícies epiteliais do trato urinário mostram diferenças na sua reatividade com as adesinas. Segundo esses autores, não basta que uma adesina se una aos receptores celulares para ser considerada como um fator de virulência, pois, além disso, esses receptores não devem ser excretados de forma solúvel na urina. Esse pré-requisito foi cumprido unicamente pela fimbria P, mas não pela fimbria tipo 1, nem pela fimbria S.

A fimbria P une-se, com diferente afinidade, à superfície epitelial de todo o trato urinário. Este fato apóia a idéia de que as cepas com fimbria P podem ascender pelo trato urinário, até o rim e, em seguida, invadir a corrente circulatória.

A fimbria S, associada à meningite e sepse, mas não à ITU, tem um padrão de união ao trato urinário semelhante ao da fimbria P. A diferença reside no fato de que na urina humana existem inibidores (principalmente a glicoproteína de Tamm-Horsfall) que, nas concentrações usuais na urina, impedem a adesão mediada pela fimbria S.

De acordo com KORHONEN et al (1988), a fimbria tipo 1 não se une ao epitélio da bexiga, e pequenas moléculas com manose, presentes na urina humana, podem impedir sua possível adesão ao trato urinário. Estes resultados descartam claramente o papel da fimbria tipo 1, como um fator de virulência nas ITU.

Como a fimbria tipo 1C pode ser expressa por cepas que também possuem a fimbria P, KORHONEN et al (1988) acreditam que devido à sua capacidade de adesão aos túbulos coletores, elas podem aumentar o poder invasivo das cepas P fimbriadas, pois essas apresentam pouca afinidade com os túbulos coletores.

A adesina O75X, também denominada hemaglutinina Dr, possibilita a colonização do trato urinário baixo e, seu poder de união às membranas basais pode representar um importante fator, quando a superfície epitelial das vias urinárias altas encontra-se traumatizada.

3.1.1. FÍMBRIA P

As fimbrias P são, segundo ORSKOV & ORSKOV (1985), as adesinas mais

importantes das *E. coli* causadoras de ITU, representando um fator de virulência característico das cepas causadoras de pielonefrite.

Segundo KÄLLENIUS et al (1981a) e SVENSON et al (1983), o receptor celular dessa adesina faz parte do antígeno do grupo sanguíneo P, sendo então denominada fimbria P. Outras denominações podem ser pilus "pap" (de pyelonephritis-associated pili) ou pilus "Gal-Gal". Os receptores para a fimbria P, compostos por glicolipídeos (alfa-D-Gal-(1-4)-beta-D-Gal), têm sido encontrados em eritrócitos e células uroepiteliais, segundo LEFFLER & SVANBORG-EDÉN (1981), ROBERTS et al (1984b) e SVENSON & KÄLLENIUS (1983).

KÄLLENIUS et al (1981b) demonstraram que a fimbria P estava presente em 91% das cepas urinárias causadoras de pielonefrite em crianças, e em apenas 7% das *E. coli* fecais de controles sadios.

DOMINGUE et al (1985) e JACOBSON et al (1985) estabeleceram respectivamente, que 100% e 90% das cepas isoladas de pacientes adultos com pielonefrite expressavam a fimbria P. DOMINGUE et al (1985) comprovaram que a fimbria P era expressa em 34% das cepas isoladas de cistite, e em 38% das isoladas de bacteriúria assintomática.

Estudos realizados, em macacos, por ROBERTS et al (1984a), (1984b) e (1985), permitiram demonstrar que a fimbria P desempenha papel decisivo no desencadeamento da pielonefrite. Ao inocularem cepas com fimbria P, na bexiga de 6 macacos, 4 deles desenvolveram pielonefrite; enquanto que nenhum dos 8 macacos inoculados com cepas de *E. coli* não portadoras de fimbria P a desenvolveram. Os macacos imunizados com fimbria P purificadas ficaram protegidos das cepas pielonefritogênicas.

ORSKOV & ORSKOV (1983b), empregando técnicas de contraímunoeletroforese, concluíram que existem 10 tipos sorológicos de fimbrias P: F7₁, F7₂, F8, F9, F10, F11, F12, F12 relacionado, F13 e F14.

ORSKOV & ORSKOV (1983b) e NIMMICH et al (1984) encontraram uma correlação entre os diferentes tipos sorológicos de fimbria P e determinados sorotipos O: K: H. Não obstante, de REE & van den BOSCH (1989) não confirmaram essa associação.

De acordo com KORHONEN et al (1982), as fimbrias P têm uma morfologia similar à da fimbria tipo 1; são apêndices retos de 5 a 7 nm de diâmetro. Possuem cerca de

1000 subunidades idênticas, denominadas fibrilinas, responsáveis pela existência dos diferentes tipos sorológicos.

Ainda que tenham sido desenvolvidas técnicas sorológicas (aglutinação, imunoprecipitação, ELISA e contraímuno eletroforese) e de hibridização de DNA, para se detectarem as cepas que expressam a fimbria P, o método mais específico e sensível consiste na aglutinação com partículas de látex unidas ao receptor da fimbria P. Esse método foi desenvolvido por SVENSON et al (1982) e (1983) e MÖLLBY et al (1983).

3.1.2. FIMBRIA S

Segundo KORHONEN et al (1985), a fimbria S une-se a receptores celulares compostos por glicoconjugados que contêm ácido siálico. Tem sido detectada em cepas de ITU mas, fundamentalmente, tem sido associada à *E. coli* causadora de sepse e meningite neonatal.

Morfologicamente, as fimbrias S são idênticas às fimbrias tipo 1 e às fimbrias P. São filamentos retos de 1 a 2 µm de comprimento e de 5 a 7 nm de diâmetro, tal como descrito por KORHONEN et al (1984).

As adesinas S hemaglutinam eritrócitos humanos em presença de D-manose (HMR). A hemaglutinação é eliminada pelo tratamento prévio dos eritrócitos com a enzima neuraminidase, ou pela incubação das bactérias com sialil alfa-(2-3)-N-acetilgalactosamina, tendo, portanto, uma forte afinidade por alfa-(2-3)-sialilgalactosídeos.

Os receptores celulares com sialilgalactosídeos estão amplamente distribuídos, segundo PARKKINEN et al (1988), nos tecidos humanos e de ratas.

3.1.3. HEMAGLUTININAS Dr

Dentre as cepas HMR⁺ que apresentavam adesinas sem um receptor de natureza química conhecida (adesina X), foram detectadas numerosas cepas do sorogrupo O75 que possuíam uma nova adesina então denominada O75X. VÄISÄNEN-RHEN (1984) examinou 15 cepas do sorogrupo O75 isoladas de ITU e comprovou que 9 delas possuíam

adesinas O75X com atividade HMR com eritrócitos humanos, mas não com eritrócitos de carneiro, nem de coelho. Na microscopia eletrônica, apresentavam, em sua superfície, umas fibrilas enroladas, muito diferentes dos apêndices retilíneos característicos das fimbrias P e da fimbria tipo 1.

Posteriormente, NOWICKI et al (1988) demonstraram que as adesinas O75X uniam-se ao antígeno do grupo sanguíneo humano Dr, motivo pelo qual são atualmente conhecidas como hemaglutininas Dr. As moléculas que contêm tirosina ou cloranfenicol, que têm estrutura similar a N-acetil-tirosina, inibem sua hemaglutinação. NOWICK et al (1988) comprovaram que os receptores para as hemaglutininas Dr também são encontrados na membrana basal tubular e na cápsula de Bowmam de rins humanos. WESTERLUND et al (1989) comprovaram que o colágeno tipo IV é o receptor na membrana basal.

NOWICKI et al (1989), utilizando uma sonda com o gene *dra D*, investigaram, por hibridização de DNA, 658 cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com ITU e de fezes de pessoas saudáveis. A hemaglutinina Dr foi detectada em 26% das cepas procedentes de cistite, em 6% das cepas de pielonefrite, em 6% das cepas de bacteriúria assintomática e em 15% das cepas fecais de controle. Os sorogrupos mais frequentemente encontrados nas cepas com hemaglutininas Dr, foram o O75, O2 e O12; mas também foram encontradas cepas Dr⁺ nos sorogrupos O1, O4, O6, O11, O15, O17, O18, O21, O78, O33 e O157.

3.1.4.FÍMBRIA TIPO 1

A fimbria somática tipo 1, também denominada fimbria tipo 1A (F₁A), caracteriza-se, fundamentalmente, segundo, DUGUID & GUILLIES (1957), BRINTON Jr (1965) e DUGUID et al (1979), por sua capacidade de hemaglutinar eritrócitos de cobaia, de forma sensível à manose. Portanto, na composição dos receptores celulares, o açúcar D-manose desempenha um papel importante.

De acordo com BRINTON Jr. (1965), DUGUID & GUILLIES (1957) e DUGUID et al (1979), a maior parte das cepas de *E. coli*, tanto patogênicas como não patogênicas, expressam a fimbria tipo 1, que segundo ADEGBOLA & OLD (1987) também é expressa por outras enterobactérias.

A fimbria tipo 1, além de aglutinar eritrócitos de cobaia na ausência de manose (manose-sensível), também adere a células de rim de macaco, a células uroepiteliais de ratos, segundo KORHONEN et al (1981). HAGBERG et al (1981) descrevem que enquanto as fimbrias com atividade HMR aderem a células uroepiteliais transitórias, a fimbria tipo 1 às células escamosas.

Os resultados de ORSKOV et al (1980) e de CHICK et al (1981) indicam que a fimbria tipo 1 também adere ao muco urinário formado pela proteína de Tamm-Horsfall. Essa proteína é encontrada livre na urina e PARKKINEN et al (1988) comprovaram que, em concentrações urinárias normais, ela inibe a adesão mediada pela fimbria tipo 1.

DUNCAN (1988) publicou que em altas concentrações a proteína de Tamm-Horsfall (maior que 100ug/ml) inibe completamente a adesão de *E. coli* HMR⁺ às células transitórias, enquanto que baixas concentrações (5 a 25 ug/ml) aumentam essa aderência.

Por outra parte, FUJITA et al (1989) observaram que a fimbria tipo 1 também possibilita a aderência de *E. coli* à superfície de células epiteliais de ureteres humanos extirpados, o que sugere que esta fimbria também pode estar implicada nas infecções urinárias altas.

Ainda que a questão não esteja definida, tem-se a idéia geral de que, se essa fimbria tiver algum papel nas ITU, este deveria ser, fundamentalmente, nas infecções baixas do trato urinário, segundo SCHAEFFER et al (1984), HOPKINS et al (1986), MOBLEY et al (1987), e VIRKOLA et al (1987).

Trabalhos experimentais em ratos, realizados por SVANBORG-EDÉN et al (1983b) e O'HALEY et al (1985), para comparar os papéis das fimbrias HMS⁺ e HMR⁺ concluíram que enquanto as HMR⁺ provocaram pielonefrite, as HMS⁺ somente induziam cistite.

3.1.5. FIMBRIA TIPO 1 C

ORSKOV & ORSKOV (1983b) demonstraram que a fimbria F1C, assemelha-se morfológica e quimicamente à fimbria tipo 1, e comprovaram que não

hemaglutina eritrócitos humanos, de macacos, de bovinos, de carneiro, de cavalo, de cobaia e nem de galinha.

PERE et al (1985) empregando anticorpos monoclonais estabeleceram a frequência das fimbrias FIC⁺ em 313 *E. coli* isoladas de infecções extra-intestinais e de fezes de pessoas sadias detectando-a em 27% das cepas pielonefritogênicas, em 13% das cepas de cistite, em 11% das cepas de bacteriúria assintomática e em 15% das procedentes de bacteriemia e meningite e em 0% das cepas fecais. Os referidos autores comprovaram que a maior parte das cepas FIC⁺ possuíam fatores de virulência adicionais, que 78% delas eram hemolíticas (Hly⁺) e que 67% expressavam fimbria P.

3.2. TOXINAS

A *Escherichia coli* pode produzir alfa hemolisina (Hly), fatores necrosantes citotóxicos (CNF1 e CNF2), enterotoxinas (LT I, LT II, STa e STb), verotoxinas (VT 1 e VT 2).

3.2.1. ALFA HEMOLISINA (Hly)

A alfa hemolisina (Hly) é considerada um importante fator de virulência das *E. coli* causadoras de ITU, sepse, apendicite, peritonite, e outras infecções extra-intestinais, desde os trabalhos de ORSKOV & ORSKOV (1985) e van den BOSCH et al (1982)

As *E. coli* Hly⁺, segundo EVANS et al (1981), GREEN & THOMAS (1981), van den BOSCH et al (1982), KORHONEN et al (1985) e CAPRIOLI et al (1987), foram isoladas mais frequentemente em ITU (34% a 60%) e em bacteriemias (25% a 38%), que em fezes de pessoas sadias (3% a 6%) segundo publicação de CZIRÓK (1985). De acordo com VÄISÄNEN-RHEN et al (1984), a porcentagem de cepas hemolíticas é maior entre as pielonefritogênicas que entre as associadas a cistite ou bacteriúria assintomática. De acordo com EVANS et al (1981), van den BOSCH et al (1982), HUGHES et al (1982) e (1983) e CZIRÓK (1985), a maioria das cepas hemolíticas (56% a 64%) pertencem aos sorogrupos O4, O6, O18, O75.

LOW et al (1984) demonstraram que, nas cepas dos sorogrupos O4 e O6, os genes que codificam para a produção de hemolisina e a capacidade HMR estão muito próximas no cromossomo. Esta observação está de acordo com a correlação encontrada entre a produção de Hly e a atividade hemaglutinante resistente à manose.

SMITH (1963) comprovou que, quando injetados intravenosamente, os extratos com altas concentrações de hemolisina eram tóxicos para camundongos.

KÉTYI et al (1983), inoculando as bactérias na bexiga de camundongos recém-nascidos, comprovaram que as amostras hemolíticas rugosas induziam infecções na bexiga e no rim, enquanto que as cepas rugosas não hemolíticas não tinham capacidade infectiva.

Para GADEBERG & LARSEN (1988) e MOBLEY et al (1990) a alfa hemolisina, além de destruir eritrócitos, resulta citotóxica sobre outras células brancas entre as quais se incluem fibroblastos, granulócitos e outros leucócitos.

MOBLEY et al (1990) observaram que a alfa hemolisina tinha um efeito nefrotóxico de destruição das células epiteliais dos túbulos proximais do nefro.

Por outro lado, GADEBERG et al (1989) demonstraram que a alfa hemolisina impede a fagocitose das *E. coli* Hly⁺ ao destruir a toxina dos fagócitos.

3.2.2. FATORES NECROSANTES CITOTÓXICOS (CNF1 e CNF2)

CAPRIOLI et al (1983) descobriram que algumas cepas de *E. coli*, isoladas de crianças com enterites, produziam uma toxina com atividade necrosante, que não era secretada livremente no meio de cultivo, denominando-a fator necrosante citotóxico (CNF).

A toxina CNF, associada à célula bacteriana, além de causar necrose na pele de coelhos, provocava segundo CAPRIOLI et al (1983) e (1984), o aparecimento de células gigantes multinucleadas, em várias linhagens de culturas celulares (HeLa, Vero, CHO, MA-104, Mac Coy), impedindo a divisão celular sem aparentemente afetar a replicação dos ácidos nucleicos. Observaram, também, que todas as suas amostras CNF⁺, isoladas de crianças com diarreia, eram também hemolíticas, e concluíram que CNF e Hly eram moléculas independentes. Posteriormente CAPRIOLI et al (1984) e De RYCKE et al (1989)

purificaram CNF, mostrando que se tratava de uma proteína de 115.000d, diferente da alfa hemolisina. Trabalhando com 100 cepas CNF⁺ CAPRIOLI et al (1987) detectaram que somente uma não era hemolítica, e propuseram a criação de dois grupos de cepas hemolíticas: cepas Hly⁺ CNF⁺ e cepas Hly⁺ CNF⁻.

CAPRIOLI et al (1987) encontraram *E coli* CNF⁺ em 37% das amostras isoladas de ITU, em 5% das amostras de pacientes com diarreia e em 0,9% daquelas isoladas de fezes de pessoas saudáveis.

Trabalhando com 123 cepas Hly⁺ isoladas de infecções extraintestinais e de fezes de crianças com e sem diarreia, CAPRIOLI et al (1989) revelaram que 76 amostras eram Hly⁺ CNF⁺ e 47 Hly⁺ CNF⁻. Das 76 cepas Hly⁺ CNF⁺, 66 (87%) pertenciam tão somente a seis sorogrupos (O2, O4, O6, O22, O75 e O83); enquanto as 47 cepas Hly⁺ CNF⁻ distribuíram-se por 21 diferentes sorogrupos O, dos quais somente 2 (O6 e O8) eram relativamente frequentes.

Não se conhece, com certeza, a localização dos genes que codificam CNF. Não obstante, CAPRIOLI et al (1987) supõe que estão no cromossomo bacteriano, já que ao examinarem o conteúdo plasmídico de 19 cepas Hly⁺ CNF⁺, 9 delas não tinham plasmídeo.

De RYCKE et al (1987) e (1990) demonstraram que a *E. coli* pode produzir 2 tipos de fatores necrosantes citotóxicos e propuseram denominá-los CNF1 e CNF2. Para esse novo grupo de cepas produtoras de CNF1 e CNF2, GONZALES & BLANCO (1989) propuseram o nome de *E. coli* necrosantes (NTEC)

As toxinas CNF1 e CNF2 podem ser distinguidas por sua atividade biológica e também por técnicas sorológicas. Em células Vero, CNF1 e CNF2 produzem efeitos muito semelhantes, praticamente indistinguíveis, mas em células HeLa provocam efeitos citopáticos diferentes, tais como descritos por De RYCKE et al (1990). Também tem-se observado que tanto os extratos ultrassônicos das cepas CNF1⁺, como das CNF2⁺ são letais para camundongos adultos, quando injetados intra-peritonealmente, e os extratos ultrassônicos das cepas CNF2⁺ apresentam uma maior atividade letal.

Outra característica que diferencia entre as NTEC é que, somente as cepas CNF1⁺ estão associadas às hemolíticas.

3.3.ANTÍGENOS O e K (SOROTIPOS O:K:H)

Os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram negativas são constituídos pelo polissacarídeo, responsável pela especificidade do antígeno O; pela região central e pelo lipídeo A hidrofóbico, que ancora a parede celular à membrana externa bacteriana.

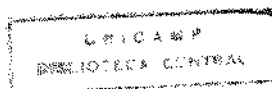
Segundo MARGET et al (1987), o lipídeo A é altamente tóxico, induz inflamação e provoca a resposta imunológica humoral específica. Acredita-se que o LPS (endotoxina) é responsável pela indução da manifestação do choque, associado com infecções severas por Gram negativos.

De acordo com SOBEL (1991), durante a cistite ou a pielonefrite, é provável que o LPS bacteriano desempenhe um papel importante, induzindo a resposta inflamatória. Em adição, o LPS é acompanhado pela síntese de IgM e IgG, primariamente direcionados ao componente lipídico A. De acordo com THULESIUS & ARAJ (1987), os lipopolissacarídeos também atuam reduzindo o peristaltismo do ureter, facilitando a ascensão da *E. coli*, até o rim, por um ureter, relativamente dilatado e hipotônico.

A cápsula polissacarídica da *E. coli* é responsável por seu antígeno K específico. Em organismos capsulados como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis*, a cápsula polissacarídica é um fator de virulência, por restringir a ação do complemento e interferindo com a fagocitose pelos polimorfonucleares neutrófilos (PMN). SVANBORG-ÉDEN et al (1987), trabalhando com camundongos com ITU ascendente e usando mutantes bacterianos, sugerem que a cápsula polissacarídica pode, de maneira semelhante "in vivo", resistir à fagocitose dentro do parênquima renal. Isso é refletido pela alta prevalência de certos antígenos K em *E. coli* isoladas de pacientes com pielonefrite. Ainda segundo SVANBORG-EDÉN et al (1987), os antígenos K mais comuns são K1, K2, K5, K13 e K51.

LINDBERG et al (1975) revelaram que 80% das cepas de pielonefrite, 59% das procedentes de cistite e 31% daquelas isoladas de casos de bacteriúria assintomática, pertenciam aos sorogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 e O75.

No Brasil, WATANABE et al (1985), trabalhando com 1113 amostras de *E.coli* isoladas de diferentes quadros clínicos, determinou o sorogrupo de 104 (25,4%) das amostras de cistite, sendo que O6 aparece em 39 (37,7%) das cepas, seguido por O18ac em



20 (19,25%), por 11 (10,5%) de O7, por 10 (9,6%) de O2 e também por O75 e em menores proporções, por O1ab,O4 e O8.

Na Tabela 5 apresentamos os sorotipos (O: K: H:), mais freqüentes entre as cepas que causam ITU.

TABELA 5 - Sorotipos de *E. coli* que causam ITU

O1: K1: H7 ou H-
O2: K1: H4 ou H-
O4: K2: H1
O4: K3
O4: K12: H1 ou H5
O6: K2: H1
O7: K1: H-
O9: K34: H-
O16: K1: H6 ou H-
O16: K2: H6
O18ac: K5: H?
O75: K5: H-

Referências:MABECK et al (1971),ORSKOV et al (1982) e SANDBERG et al (1988).

SANDBERG et al (1988) revelaram que 65% das cepas isoladas de pielonefrite não complicada englobavam-se em somente 9 sorotipos (O1: K1: H7, O1: K1: H-, O2: K1: H-, O4: K12: H1, O7: K1: H-, O9: K34: H-, O16: K1: H6, O16: K1: H- e O75: K5: H-). As cepas desses 9 sorotipos foram encontradas somente em 10% dos casos complicados por uma enfermidade de base, em 30% das pielonefrites com anormalidades anatômicas e somente em 9% dos casos de cistite.

Trabalhando com cepas isogênicas O75⁺K5⁺ e O75⁻K5⁺, HAGBERG et al

(1984) chegaram a conclusão de que o antígeno O facilitava a persistência do microrganismo na bexiga e rim de camundongos. Não obstante quando se comparou a toxicidade dos antígenos O de *E. coli* extraintestinais com os antígenos O de *E. coli* da flora normal, não foram detectadas diferenças.

A quantidade de antígenos K presente parece ser importante para a virulência de *E. coli*. Assim, KAIJSER et al (1977) confirmaram que as cepas de *E. coli* pielonefritogênicas, além de possuírem o antígeno K mais frequentemente, também possuíam maior quantidade deste antígeno que as cepas isoladas de cistite ou das fezes de pessoas saudáveis.

Por sua vez, KETYI et al (1983) inocularam cepas rugosas K1⁺ e K1⁻, na bexiga de camundongos lactentes, através da parede abdominal. A infecção na bexiga e no rim, observada após 2 a 3 semanas de incubação, levou os autores a concluir que a presença do antígeno K aumenta a virulência das bactérias. GLYNN & HOWARD (1970), trabalhando com antígeno K, revelam que esse antígeno recobre as bactérias, protegendo-as da fagocitose e da ação bactericida do complemento sérico.

3.4. RESISTÊNCIA AO SORO E À FAGOCITOSE

De acordo com TAYLOR et al (1980), a *E. coli* pode ser morta pelo soro, devido à ação do complemento. As cepas de *E. coli* com a molécula completa do polissacarídeo O são menos susceptíveis ao poder bactericida do soro que as semi-rugosas ou rugosas. Segundo SVANBORG-EDÉN et al (1987), a resistência ao soro é, em parte, dependente do LPS da parede bacteriana, mas não é significativamente influenciada pelo polissacarídeo capsular. Esse fato tem sido contestado por LEYING et al (1990) que, recentemente, descreveram um método, utilizando mutantes K1 polissacarídeo negativo e publicaram que a expressão capsular K1 é um pré-requisito para a resistência ao soro, e que a perda da capacidade de sintetizar K1 acarreta a perda da resistência ao soro.

Apesar da estreita correlação entre a atividade bactericida do soro e a capacidade da *E. coli* de invadir a corrente circulatória e nela sobreviver, os mecanismos que possibilitam essa resistência não estão bem claros. A resistência ao soro parece ser um

problema multifatorial, estando implicados tanto os antígenos K, como os O e algumas proteínas da membrana externa.

De todo modo, a questão é controversa e apresenta resultados divergentes.

Após quantificar o antígeno K, GLYNN e HOWARD (1970) observaram que as cepas ricas nesse antígeno resistiam melhor à atividade bactericida do soro que as cepas com pouca quantidade de antígeno K; ao passo que TAYLOR (1976) não encontrou correlação entre a quantidade de antígeno K e a suscetibilidade à ação bactericida do soro.

CROSS et al (1984) observaram que 95% das cepas de bacteriemia eram resistentes ao soro, relacionando esta habilidade com a presença do antígeno K1 e outros antígenos K.

Segundo McCABE et al (1978), HUGHES et al (1982) e TAYLOR (1984), os lipopolissacárides da parede celular também desempenham um importante papel na resistência ao soro, comprovando que as cepas dos sorogrupos O6, O7, O18 e O75 são mais resistentes que cepas de outros sorogrupos. Além disso, é bem conhecido o fato de que as cepas lisas, que, por mutação, se transformam em rugosas, podem passar a ser sensíveis ao soro.

HUGHES et al (1982) encontraram uma associação entre a produção de alfa-hemolisina e a resistência ao soro, nas cepas de *E. coli* causadoras de ITU dos sorogrupos O6, O18 e O75.

CROSS et al (1984) chegaram a conclusão de que o antígeno K1, mas não outros antígenos K, protegia a bactéria da fagocitose. A resistência à opsonofagocitose, pelo soro humano e leucócitos polimorfonucleares, por parte das cepas K1⁺ parece ser devida ao baixo poder imunogênico desse antígeno K1.

3.5. AEROBACTINA

CARBONETTI et al (1986) encontraram o sistema de captação de ferro aerobactina em 69% das *E. coli* isoladas de bacteriemia, em 75% das pielonefritogênicas, em 60% das obtidas de cistite e em 34% das *E. coli* fecais isoladas de pacientes sadios. De forma análoga, ORSKOV et al (1989) detectaram o sideróforo aerobactina em 76% das *E. coli* pielonefritogênicas, em 56% das isoladas de cistite e em 43% das isoladas de bacteriúria.

assintomática e das fezes de pessoas saudáveis. JACOBSON et al (1988) além de detectar a expressão da aerobactina, mais frequentemente em casos de pielonefrite (72%) que em casos de cistite (42%), encontraram uma correlação significativa entre a produção de aerobactina e a expressão da fimbria P. Assim, 75% das cepas com aerobactina expressaram a fimbria P, frente a somente 46% de cepas aerobactina positiva dentre as que não expressavam P. GADÓ et al (1989) mostraram que a produção de aerobactina era mais frequente nas cepas HMR⁺, hemolíticas, K1⁺ ou K5⁺, que nas cepas que não possuíam esses fatores de virulência.

MONTGOMERIE et al (1984) também observaram que a presença de aerobactina correlacionava-se com a letalidade, mas não com a infecção renal dos camundongos; o que sugere que a aerobactina pode desempenhar um papel importante na invasão da corrente circulatória.

A *E. coli*, além da aerobactina, pode expressar outro sideróforo conhecido como enterobactina. Este segundo sideróforo, implicado na captação de Fe⁺³, é encontrado praticamente em todas as *E. coli*, patogênicas ou não.

A enterobactina mostra uma maior afinidade pelo Fe⁺³ que a aerobactina; mas sua afinidade "in vivo" reduz-se muito ao ser bloqueada com soroalbumina, e suas moléculas se decompõem depois de um único uso

4.ASPECTOS DA RELAÇÃO PARASITA/ HOSPEDEIRO

KORHONEN et al (1990) referem que os fatores mecânicos de proteção das superfícies epiteliais, por exemplo: fluxo urinário, peristaltismo intestinal e secreção salivar, são importantes na defesa contra as bactérias. Para colonizar o epitélio o microrganismo necessita vencer o efeito desses fluxos aderindo firmemente ao local da infecção. A adesão é necessária tanto para a bactéria causar doença, quanto para estabelecer-se como constituinte da nossa flora normal.

A difusão do microrganismo pelo trato urinário depende não somente dos fatores de virulência da bactéria, mas também das defesas do hospedeiro presentes na urina, bexiga, ureter e rim.

Existem mecanismos de antiaderência no trato urinário, que podem ser

específicos (por ex: imunoglobulinas) ou completamente inespecíficos, interferindo com a colonização de todos os organismos. (Tabela 6)

TABELA 6 - Mecanismos de antiaderência de defesa do hospedeiro

Físicos
efeito mecânico do fluxo da micção
exfoliação de células eucarióticas
Oligossacarídeos urinários
Imunoglobulinas urinárias(SIgA)
Proteína urinária de Tamm-Horsfall
Mucopolissacarídeo da mucosa (glicosaminoglican)

Referência: SOBEL (1991)

CHAN et al (1985) mostraram que os lactobacilos podem fazer uma exclusão competitiva dos uropatógenos nas células uroepiteliais humanas, interferindo assim com a adesão.

STAMEY et al (1971) e (1973) e PFAU & SACHS (1981), observaram que a mucosa vaginal está normalmente colonizada por lactobacilos, porém, em mulheres com ITU de repetição, a superfície mucosa do intróito vaginal apresenta-se colonizada com microrganismos entéricos. Segundo FOWLER & STAMEY (1977), KÄLLENIOUS & WINBERG (1978) e SCHAEFFER et al (1984), esse fato tem sido atribuído a um aumento na receptividade das células vaginais e uroepiteliais, à adesão de cepas de *E. coli*.

De acordo com SVANBORG-EDÉN et al (1983A), essa maior receptividade é, provavelmente controlada por fatores genéticos que, segundo SCHAEFFER et al (1984), refletem-se pela prevalência de certos tipos de HLA ou, de acordo com LOMBERG et al (1983), relacionam-se com substâncias de grupos sanguíneos, que podem aparecer na superfície de células uroepiteliais, funcionar tanto como receptores para a adesão de estruturas de superfície das bactérias, quanto como bloqueadores da adesão a receptores menos proeminentes. Segundo KINANE et al (1982), pacientes não secretores dos grupos

sanguíneos AB e B apresentam um maior risco à ITU em comparação aos pacientes secretores ou àqueles com outros grupos sanguíneos. De acordo com SHEINFELD et al (1989), existe uma hipótese de que a superfície das células epiteliais dos secretores está associada a oligossacarídeos dos grupos sanguíneos A, B e H, que podem encobrir os receptores menos proeminentes para a aderência bacteriana, prevenindo, dessa maneira, a adesão.

ORSKOV et al (1980) mostraram que o uromucoide urinário (proteína de Tamm-Horsfall) rico em resíduos de manose, adere avidamente a *E. coli* e pode impedir a ligação às células uroepiteliais.

SVANBORG-EDÉN et al (1978) comprovaram que as imunoglobulinas IgG, IgA e SIgA presentes na urina de pacientes com pielonefrite pode inibir a aderência das *E. coli* à células uroepiteliais.

PARSONS et al (1977) e (1980) identificaram outro mecanismo natural de antiaderência, na bexiga de várias espécies animais: cães, coelhos, ratos e camundongos. Sob condições experimentais, a bexiga é resistente a colonização, apesar da inoculação de grande número de bactérias patogênicas. Após um tratamento rápido da bexiga com ácido clorídrico diluído, ocorre um dramático aumento da aderência e colonização por diversas bactérias testadas, incluindo *E. coli*. Essas observações suportam o conceito de um mecanismo natural de superfície, sensível a ácido. Após 24h do tratamento com o ácido a função de antiaderência retorna na bexiga intacta. PARSONS et al (1975) e (1979) realizando estudos histológicos em bexigas humanas e de animais identificaram uma fina camada de mucopolissacarídeos recobrando as células epiteliais transicionais da mucosa vesical. Técnicas histoquímicas tem revelado uma depleção do mucopolissacarídeo após o tratamento ácido. Após 24 horas esta camada torna-se novamente visível e acredita-se que seja regenerada localmente pelas células transicionais (PARSONS 1979). A análise química do mucopolissacarídeo tem revelado um glicosaminoglicam hidrofílico que atrai um filme aquoso, de água ou urina, sobre essa superfície (PARSONS 1979). Não está claro como o mucopolissacarídeo interfere com a aderência.

PARKINNEN et al (1988) em humanos, mostraram que a urina normal contém numerosos oligossacarídeos incluindo mono-oligossacarídeos, que inibem a adesão da fimbria tipo 1. e que o maior inibidor da fimbria S é a glicoproteína de Tamm-Horsfall.

Quanto a fimbria P, nenhum inibidor solúvel foi encontrado na urina.

SCHIFFERLI et al (1986), trabalhando com agentes antimicrobianos usados com sucesso na profilaxia da I.T.U. por longos períodos, conseguiram demonstrar que seus efeitos protetores em doses subterapêuticas podem ser explicados pois, em doses extremamente baixas, esses agentes inibem a expressão de fimbrias, sem afetar o crescimento bacteriano

4.1. ADAPTAÇÃO, "IN VIVO", DOS FATORES DE VIRULÊNCIA

As cepas de *E. coli* uropatogênicas são selecionadas da flora fecal em virtude de suas habilidades de colonizar, persistir e induzir inflamação no trato urinário. Quando a *E. coli* alcança o parênquima renal a inflamação inicia-se, freqüentemente, na medula. Após a invasão, alguns dos fatores de virulência bacterianos não mais constituem uma vantagem biológica e, de fato, podem comprometer a sobrevivência bacteriana dentro do rim.

Após entrar no rim, a *E. coli* não mais expressa fimbria tipo 1, e esta adaptação biológica é denominada variação de fase. SILVERBLATT (1974) e OFEK et al (1981) concluíram que bactérias fimbriadas são mais virulentas na fase de colonização ou aderência, enquanto que bactérias afimbriadas podem ser mais virulentas nas fases de invasão e hematogênica.

Outras características desses microrganismos incluem a perda dos antígenos O e K o que torna-os menos vulneráveis à resposta inflamatória normal do hospedeiro.

De acordo com, SVANBORG-ÉDEN et al (1984), a fimbria tipo 1 pode ser um facilitador do reconhecimento bacteriano e da fagocitose por polimorfonuclear (PMN), pois estes possuem resíduos de manose na membrana celular que atuam como receptores naturais para essas fimbrias. Nos PMN, não tem sido encontrado receptores correspondentes a nenhuma outra adesina bacteriana.

De acordo com SVANBORG-EDÉN & de MAN (1987), as cepas pielonefritogênicas aderem em maior número, às células epiteliais que forram o trato urinário. ORSKOV & ORSKOV (1983a), publicaram que mais de 80% das cepas pielonefritogênicas pertencem a 8 antígenos O : O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18, O75. Os antígenos K mais comuns são K1, K2, K5, K12, K13. A distribuição dos antígenos O e K

das cepas pielonefritogênicas diferem, segundo LINDIN-JANSON (1977), daquelas que causam cistite ou bacteriúria assintomática e também das *E. coli* isoladas da flora fecal.

A aderência "in vitro" das cepas de *E. coli* pielonefritogênicas é maior que a das cepas de cistite, ou das obtidas de pacientes com bacteriúria assintomática. A menor aderência é observada com as cepas fecais.

SVANBORG-ÉDEN et al (1976) e KÄLLENIUS et al (1981a) mostraram que o aumento na capacidade de aderir pode ser observado nas *E. coli* pielonefritogênicas isoladas de bebês, crianças, adultos e idosos de ambos os sexos, sendo que as adesinas mais específicas são as fimbrias P e S.

Segundo LINDIN-JANSON et al (1977), a produção de hemolisina é mais encontrada nas cepas pielonefritogênicas que nas de cistite, especialmente se acompanhadas por bacteriemia.

ORSKOV & ORSKOV (1983a), e SVANBORG-EDÉN et al (1987) sugerem que a maioria das *E. coli* uropatogênicas, pertence a um pequeno número de clones que têm acumulado múltiplas propriedades de virulência e que aumentam sua habilidade de infectar o trato urinário.

As cepas de *E. coli*, associadas à pielonefrite e urosepse, têm adquirido vários fatores de virulência mediados por cromossomos, enquanto que cepas associadas à cistite possuem menos fatores de virulência.

Esses achados sugerem que, na ausência de fatores predisponente dos hospedeiro, os fatores de virulência desempenham um maior papel na infecção alta do trato urinário, que nas infecções baixas.

As análises dos fatores de virulência em urina recém emitida indicam que quanto mais comprometido o trato urinário, menos se encontra expressão fenotípica ou capacidade genética de produzir fatores de virulência nessas pacientes.

Esta conclusão pode refletir que temos ainda que identificar outros relevantes fatores de virulência para a bexiga.

II- OBJETIVOS

1-Correlacionar a resposta local da mucosa vesical, de pacientes com cistite, com os fatores de virulência produzidos pelas respectivas cepas de *E.coli*.

2- Analisar a dependência na produção e/ou expressão dos diferentes fatores de virulência, frente a idade das pacientes.

III - CASUÍSTICA E MÉTODOS

1 . PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

1.1 PACIENTES

Foram selecionadas 159 pacientes, do sexo feminino, em diferentes faixas etárias, atendidas nos ambulatórios do Hospital das Clínicas da Unicamp, apresentando quadro clínico de cistite. O diagnóstico laboratorial foi realizado no Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Foram excluídas as pacientes que no momento da coleta, apresentassem febre, dor a punho percussão (sinal de Giordano) e/ou mal estado geral que pudesse caracterizar suspeita clínica de pielonefrite aguda ou qualquer quadro infeccioso. Pacientes sabidamente com anomalias do trato urinário, ou qualquer doença de base também foram excluídos. Nenhuma paciente fazia uso de antibióticos nas 2 semanas que antecederam a coleta.

1.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA CISTITE

O diagnóstico de cistite foi baseado em:

- 1) critérios clínicos: ardor à micção, polaquiúria, urgência urinária e/ou perda urinária de esforço;
- 2) urocultura com contagem de colônias superior a 100.000 UFC/ml, com crescimento de um único tipo de microrganismo.

1.1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS PACIENTES QUANTO A RESPOSTA MUCOSA LOCAL

A quantificação dos leucócitos e hemácias na urina permitiu, juntamente com a presença de bacteriúria, a avaliação da resposta do hospedeiro. Assim, as pacientes apresentaram 3 tipos de resposta:

- a) presença de bacteriúria com leucocitúria (BL);
- b) presença de bacteriúria com leucocitúria e hematúria (BLH);
- c) presença de bacteriúria sem leucocitúria (B).

1.1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO A IDADE.

As 159 pacientes foram subdivididas em 4 grupos, tomando-se como base a idade de 50 anos. Inicialmente foram analisadas as pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos e aquelas com idade igual ou superior a 50 anos. Posteriormente, os fatores de virulência foram analisados em mais 2 faixas etárias: igual ou inferior a 30 anos e igual ou superior a 60 anos.

A pesquisa da dependência entre os fatores de virulência foi realizada nesses 4 grupos de pacientes.

2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.1. COLETA DA URINA

A coleta foi realizada com a paciente em posição ginecológica, após assepsia genital. Após a retirada do antisséptico com água e secagem dos genitais com gaze estéril, solicitava-se à paciente que iniciasse a micção, e era coletado, em frasco estéril, o segundo jato da primeira micção da manhã, ou uma amostra de urina após estase vesical superior a 4 horas. Nas crianças, foi praticada a mesma metodologia, com troca do saquinho coletor estéril a cada 30 minutos. Em nenhuma das pacientes foi realizada a sondagem vesical.

2.2 UROCULTURA

A semeadura da urina foi realizada em, no máximo 10 minutos, com alça calibrada que transporta 0,01 ml, inicialmente em um meio pobre em eletrólitos (CLED), para obtenção de crescimento homogêneo dos germes mais frequentes e para impedir que as amostras de *Proteus* desenvolvessem seu véu. Assim esse meio possibilita a contagem das colônias.

Uma segunda aliquota de urina foi semeada, por esgotamento, no meio de Eosina Azul de Metileno (EMB), para obtenção de colônias isoladas e verificação da pureza da cultura. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas.

O número total de bactérias pode ser obtido contando-se as unidades formadoras de colônias e multiplicando-as pelo fator de diluição 100.

Consideramos positivas, ou seja presença de bacteriúria, as urinas que apresentaram contagem superior a 10^5 UFC/ml, com crescimento de um único tipo de microrganismo (cultura pura).

O crescimento de mais de um tipo, independentemente da contagem, foi interpretado como contaminação da amostra e nova coleta foi realizada.

2.3. IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *E.coli*

Uma colônia isolada da placa com EMB foi semeada nos meios de EPM, MILi e citrato segundo Simmons, nessa ordem, com o mesmo inóculo. Os 8 testes quando considerados conjuntamente com a reação de fermentação da lactose, observada na placa de EMB, permitem identificar com fidelidade a grande maioria das enterobactérias isoladas de espécimes clínicos, especialmente as cepas de *E.coli*.

MEIO DE EPM (TOLEDO et al 1982a)

O meio de EPM é uma modificação do antigo meio de Rugai e Araújo e contém os seguintes testes: produção de gás por fermentação da glicose; produção de H₂S; hidrólise da uréia e desaminação do triptofano.

MEIO DE MILi (TOLEDO et al 1982b)

O meio de MILi permite pesquisar a motilidade, a produção do indol e a descarboxilação da lisina.

Das amostras com bacteriúria, a cepa identificada como *E.coli* foi repicada no meio de Lignières e estocada a temperatura ambiente e também refrigerada.

2.4. QUANTIFICAÇÃO DOS LEUCÓCITOS E HEMÁCIAS NA URINA.

Uma alíquota de urina sem centrifugar foi colocada em câmara de Fucks-Rosenthal montada com lâminula. As hemácias e leucócitos foram contados e o valor encontrado multiplicado por 1000 para obtermos o número/ml. Não foram visualizados cilindros em nenhuma das amostras, e também não foi observado dismorfismo eritrocitário.

Consideramos leucocitúria a contagem igual ou superior a 4000/ml e hematúria, a contagem igual ou superior a 3000/ml.

2.5. DETECÇÃO DA FÍMBRIA TIPO 1

A partir da cultura estoque, a cepa foi repicada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubada a 37°C. Após 24 horas de incubação, foram semeadas em CFA (EVANS et al 1980) e reincubadas por 24 horas a 37°C.

O crescimento bacteriano foi suspenso em salina fosfatada (PBS) e frente à escala 3 de Mac Farland, ajustado o número de células totais para aproximadamente 9×10^8 células/ml.

As hemácias de cobaia foram coletadas no dia do teste, em citrato de sódio 3,8%. Foram lavadas por 3 vezes em PBS. Da papa de hemácias, foram feitas 2 suspensões a 2% em PBS, a primeira em PBS sem manose e a segunda em PBS com 1% de D-manose (SIGMA) (PBS-M).

Os testes foram realizados em lâminas de vidro, em banho de gelo. Sobre a lâmina foi colocada uma gota da suspensão de hemácias em PBS e do outro lado 1 gota da suspensão de hemácias em PBS-M. Sobre cada uma delas foi adicionada 1 gota da suspensão bacteriana. Após homogeneização, consideramos positiva a presença de hemaglutinação, que aparece em até 2 minutos.

Uma cepa possui atividade hemaglutinante na presença de D-manose (cepa HMR⁺), quando hemaglutina a hemácia de cobaia na presença ou ausência de D-manose com a mesma intensidade. Considera-se que uma cepa possui atividade hemaglutinante sensível a D-manose (HMS⁺) quando hemaglutina hemácias de cobaia somente na ausência da D-manose.

A bactéria que expressa fimbria tipo 1 pode ser caracterizada por uma HMS⁺ com hemácias de cobaia.

2.6. DETECÇÃO DA FÍMBRIA P

As cepas de *E.coli*, foram semeadas em BHI caldo e incubadas a 37°C. Após 24 horas foram repicadas em CFA (EVANS et al, 1980) e novamente incubadas a 37°C por mais 24 horas. As bactérias foram suspensas em PBS seguindo a escala 3 de Mc Farland.

Foi utilizado o reativo PF-test da Orion Diagnostica (Finlândia). Cada cartão contém uma gota dessecada de partículas de látex aderidas ao receptor da fimbria P (alfa-D-Gal-(1-4)-beta-D-Gal) e outra gota dessecada de partículas de látex sem o

dissacarídeo. Foi adicionada uma gota da suspensão bacteriana a ser testada, e agitada para homogeneizar por 2 minutos.

A presença de aglutinação confirma que a cepa de *E.coli* expressa a fimbria P.

2.7. DETECÇÃO DA FÍMBRIA S

As cepas foram cultivadas em CFA (EVANS et al 1980), incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente, suspensas em PBS.

A fimbria S foi detectada seguindo a técnica descrita por KORHONEN et al (1984), tratando previamente as hemácias humanas com neuraminidase.

Assim, cepas que perdem a capacidade de hemaglutinação após o tratamento dos eritrócitos, podem ser denominadas fimbrias S, pois a neuraminidase retira os resíduos de ácido siálico, receptor dessa fimbria, da superfície celular.

2.8. DETECÇÃO DA HEMAGLUTININA Dr

A hemaglutinina Dr foi pesquisada em 21 amostras de *E.coli* que apresentavam HMR⁺ com hemácias humanas do fenótipo P1⁺ e que não expressavam a fimbria P.

As cepas foram cultivadas em Luria ágar, incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente suspensas em PBS contendo 20 microgramas/ml de cloranfenicol, segundo descrito por NOWICKI et al (1988).

Foram consideradas como positivas para expressão da hemaglutinina Dr, as cepas cuja aglutinação frente a hemácias humanas foi inibida pelo cloranfenicol

2.9. DETECÇÃO DA HEMOLISINA

Foram semeadas por picada, 10 cepas por placa contendo ágar com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foram observados os halos de hemólise total (beta hemólise) produzidos pela alfa hemolisina (Hly).

2.10. DETECÇÃO DO FATOR NECROSANTE CITOTÓXICO

2.10.1. OBTENÇÃO DE EXTRATOS COM MITOMICINA C

O experimento para obtenção de extratos com mitomicina C foi realizado, segundo BLANCO et al (1990), semeando a cepa de *E.coli* em 5ml de TSB (pH 7,5) em erlemeyer de 50ml e incubando-o (37°C/5h) com agitação. Foi adicionado à cultura, 20 µl de uma solução de mitomicina C, de maneira que a concentração final no meio fosse de 0,5 µl/ ml . Incubou-se novamente por mais 15 horas. A cultura foi centrifugada a 6000xg por 15min a 4°C, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22µm (Millipore).

Os extratos com mitomicina C, assim obtidos, conservam-se a 4°C por no máximo 2 semanas.

2.10.2. DETECÇÃO DE TOXINAS EM CÉLULAS VERO E HeLa.

As monocamadas celulares foram tratadas com tripsina e ajustadas para a concentração celular de 2×10^5 células/ml, em meio de manutenção suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram distribuídas em microplaca de 96 orifícios de fundo chato, e incubadas (37°C/5% CO₂/24h) até obtenção de monocamadas confluentes. No momento do

ensaio, o meio de cultura foi retirado e adicionado o meio essencial mínimo com solução salina de Earle (MEM), com antibióticos (penicilina, estreptomicina, polimixina B e fungizon) e metil isobutilxantina (0,05mM) (Sigma) como inibidor da fosfodiesterase. Foram adicionados 100µl do extrato com mitomicina C a cada orifício, a placa foi incubada (37°C/5% CO₂) e a leitura efetuada após 24 e 48 horas, em microscópio invertido.

2.11. SOROTIPAGEM: DETERMINAÇÃO DO SOROGRUPO O

A determinação do sorogrupo das 159 cepas de *E.coli*, de nosso estudo, foi realizada frente aos 167 antissoros O.

2.11.1. PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

Após cultivo em TSA por 24 h/ 37°C, as bactérias foram suspensas em dois tubos contendo 2ml de solução salina, ajustada para a concentração de $1,8 \times 10^9$ bactérias/ml (escala 6 de Mc Farland). Os tubos foram aquecidos para expor o antígeno O.

2.11.2. DETERMINAÇÃO PRESUNTIVA DO ANTÍGENO O

As suspensões bacterianas aquecidas, foram colocadas frente a todos os antissoros.

Quando a cepa apresentava aglutinação frente a um dos antissoros O, procedemos a titulação do antígeno O (prova confirmativa). A cepa que não apresentava aglutinação frente a nenhum dos antissoros, foi considerada como não tipavel (NT) (BLANCO et al 1992).

2.11.3. CONFIRMAÇÃO DO SOROGRUPO O

A titulação quantitativa para confirmação do antígeno O, foi realizada com antissoros com título alto (superior a 1/640), diluído a 1/80 no momento do uso. Para a identificação do sorogrupo de cada cepa, foram considerados apenas os títulos com valores iguais ou superiores aos obtidos com a cepa homóloga.

A sorogrupagem de nossas cepas, foi realizada pelo Professor Jorge Blanco da Universidade de Santiago de Compostela, na Faculdade de Veterinária, Lugo, Espanha.

2.12. CONSERVAÇÃO DAS CEPAS

As cepas foram semeadas, por picada, em ágar Lignières e conservadas a temperatura ambiente e também refrigeradas, mantendo-se viáveis, sem necessidade de repiques, por pelo menos 3 anos.

2.13. CEPAS DE *E.coli* DE REFERÊNCIA

Em todos os ensaios foram empregadas cepas de *E.coli* controles positivas e negativas para cada característica a ser estudada.

Cepa de *E.coli* E123 : fimbria P⁺, fimbria tipo 1⁻, HMR⁺ hemácias humanas. Gentilmente cedida pelo Dr Ken-ichi Tomochica, F.C.M., Universidade de Okayama, Okayama, Japão.

Cepa de *E.coli* ORN115: fimbria tipo 1⁺.Gentilmente cedida pelo Dr ORNDORFF.

Cepa de *E.coli* MR 48 (CNF1⁺) e B 20a (CNF2⁺), gentilmente cedidas pelo Prof.Jorge Blanco, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha.

IV - RESULTADOS

1- ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ACORDO COM O QUADRO CLÍNICO LABORATORIAL E FAIXA ETÁRIA.

Das 159 pacientes estudadas, em 41 (25,8%), não foi detectada leucocitúria, 67 (42,1%) apresentaram somente leucocitúria e 51 (32,1%) cursaram com leucocitúria e hematúria, evidenciando que na vigência da resposta inflamatória local, esta pode ocorrer com ou sem sangramento.(Tabela 7).

Salientamos que, todas as 41 pacientes sem leucocitúria (B) evoluíram também sem hematúria, sugerindo que esta ocorre somente na presença do processo inflamatório.

TABELA 7 - Distribuição das pacientes segundo o quadro clínico-laboratorial baseado na quantificação dos leucócitos e hemácias na urina.

Quadro clínico	Número de pacientes (%)
BL	67 (42,1%)
BLH	51 (32,1%)
B	41 (25,8%)
TOTAL	159

BL : bacteriúria com leucocitúria

BLH: bacteriúria com leucocitúria e hematúria

B : bacteriúria sem leucocitúria e sem hematúria

1.1. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA DAS PACIENTES NOS GRUPOS BL, BLH E B.

Analizamos a distribuição etária de nossa população, visto que a idade pode interferir na resposta da paciente. (Tabela 8).

TABELA 8- Análise da idade das pacientes nos 3 grupos

Variáveis	Grupos de pacientes		
	BL	BLH	B
número de pacientes	67	51	41
idade máxima	82	77	76
idade mínima (anos)	2	0,08	8
idade média	34,82	34,85	43,78
desvio padrão	19,89	20,72	18,09

BL= bacteriúria com leucocitúria
BLH= bacteriúria com leucocitúria e hematúria
B= bacteriúria sem leucocitúria e sem hematúria

A análise estatística segundo o teste de Kruskal-Wallis mostra que, nos grupos BL e BLH, a idade das pacientes não é significativamente diferente (semelhantes), porém o grupo B é composto por mulheres significativamente mais idosas.(valor do teste=6,27 e p=0,043).

Inicialmente, subdividimos as pacientes em duas faixas etárias e analisamos a homogeneidade dos dois grupos com corte em 50 anos.

- 1) pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos
- 2) pacientes com idade igual ou superior a 50 anos.(Tabela 9)

TABELA 9 -Distribuição dos grupos BL, BLH e B segundo duas faixas etárias: menor ou igual a 49 anos e maior ou igual a 50 anos.

Grupos	Faixas etárias(anos)		
	<= 49	>=50	TOTAL
BL	51	16	67
BLH	40	11	51
B	27	14	41
TOTAL	118	41	159

BL = bacteriúria com leucocitúria BLH= bacteriúria com leucocitúria e hematúria B = bacteriúria sem leucocitúria e sem hematúria.

A análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis mostra que, não existe diferença significativa de idade entre as pacientes que constituem os grupos BL, BLH e B, quando consideradas as faixas inferior ou igual a 49 anos (valor do teste= 4,82 e p=0,089) ou superior ou igual a 50 anos (valor do teste=0,86 e p=0,65)

1.2. - DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES EM RELAÇÃO À IDADE DAS PACIENTES.

Analizando a Tabela 10, notamos que, dentre as 41 pacientes com idade igual ou superior a 50 anos, 16 (39%) apresentaram BL, 11 (26,8%) apresentaram BLH e 14 (34,1%) apresentaram somente B.

A produção de hemolisina foi mais freqüente entre as cepas isoladas de B 7(50%), estando presente em somente 3(27%) das BLH, porém, não há prevalência significativa de Hly, em nenhum dos três grupos.

A fimbria tipo 1 foi expressa por 6 (54,7%) das cepas de BLH e por 6 (37,5%) das BL, porém, foi, também, expressa por 7 (50%) das B, mostrando, assim, não haver prevalência significativa em nenhum dos grupos.

O fator necrosante citotóxico (CNF1) foi produzido por 2 (12,5%) das cepas de BL, por 4 (36,4%) das cepas BLH e por 4 (28,6%) das amostras B, o que, estatisticamente, não apresenta diferença significativa entre as frequências para nenhum dos grupos.

A fimbria P foi expressa por 2 (12,5%) das cepas de BL, aparecendo em maior porcentagem dentre as cepas de BLH (27,3%) e em 2 (14,3%) das cepas B, porém, sua presença não é significativa em nenhum dos três grupos de pacientes.(Tabela 10).

TABELA 10 - Fatores de virulência das cepas de *E.coli* isoladas de pacientes com idade igual ou superior a 50 anos.

Grupos	Nº Pacientes (%)	Fatores de virulência (%)			
		Hly ⁺	tipo 1	CNF1 ⁺	FP ⁺
BL	16(39,0)	5 (31,2)	6 (37,5)	2 (12,5)	2 (12,5)
BLH	11(26,8)	3 (27,3)	6 (54,7)	4 (36,4)	3 (27,3)
B	14(34,1)	7 (50,0)	7 (50,0)	4 (28,6)	2 (14,3)
TOTAL	41	15 (36,6)	19 (46,3)	10 (24,4)	7 (17,1)

BL = bacteriúria com leucocitúria sem hematúria
 BLH = bacteriúria com leucocitúria e hematúria
 B = bacteriúria sem leucocitúria e sem hematúria.
 Hly⁺=produção de hemolisina.(x²=1,69, GL=2, p=0,428).
 tipo 1 =expressão de fimbria tipo 1.(x²=0,87, GL=2 ,p=0,645)
 CNF1⁺ =produção do fator necrosante citotóxico.(x²=2,21, GL=2, p=0,330).
 FP⁺ =expressão da fimbria P.(x²=1,12, GL=2, p=0,570).

Na tabela 11 mostramos a frequência dos fatores de virulência, nas pacientes com idade inferior ou igual a 49 anos.

Os fatores de virulência Hly, fimbria tipo 1 e CNF1 distribuem-se homogeneamente nos três grupos, porém, a expressão da fimbria P foi significativamente mais freqüente entre as amostras de *E.coli* isoladas de pacientes com leucocitúria (BL) ou com leucocitúria e hematúria (BLH).

TABELA 11 - Fatores de virulência das cepas de *E.coli* isoladas de pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos.

Grupos	Nº Pacientes (%)	Fatores de virulência (%)			
		Hly ⁺	tipo 1	CNF1 ⁺	FP ⁺
BL	51(43,2)	19 (37,2)	26 (51,0)	12 (23,5)	12 (23,5)
BLH	40(33,9)	17 (42,5)	18 (45,0)	10 (25,0)	15 (37,5)
B	27(22,9)	7 (25,9)	15 (55,5)	9 (33,3)	2 (7,4)
TOTAL	118	43 (36,4)	59 (50,0)	31 (26,3)	29 (24,6)

BL = bacteriúria com leucocitúria
 BLH = bacteriúria com leucocitúria e hematúria
 B = bacteriúria sem leucocitúria e sem hematúria.
 Hly⁺= produção de hemolisina.(x²=1,93; GL=2; p=0,379
 tipo 1=expressão da fimbria tipo 1.(x²=0,75; GL=2; p=0,686).
 CNF1⁺ = produção do fator necrosante citotóxico.(x²=0,926, GL=2, p=0,629)
 FP⁺ = expressão da fimbria P.(x²=7,92, GL=2; p=0,018)

Para correlacionar a presença desses fatores de virulência com a leucocitúria, passamos a comparar os dois extremos de nossa amostragem, ou seja, as pacientes com bacteriúria sem leucocitúria (B) frente àquelas com bacteriúria e leucocitúria com ou sem hematúria (BL+H), porém, com número de leucócitos superior a 1.000.000/ml. Dessa maneira, estamos comparando dois tipos de resposta inflamatória mucosa local: ausência de leucócitos e presença de intensa leucocitúria (Tabela 12).

TABELA 12. Fatores de virulência das amostras de *E.coli* isoladas de pacientes com quadro clínico-laboratorial de cistite: comparação entre os grupos B e BL+H.

Grupos	Nº Pacientes	Fatores de virulência (%)			
		Hly ⁺	tipo 1	CNF1 ⁺	FP ⁺
B	41	14(34,1)	22(53,7)	13(31,7)	4 (9,8)
BL+H	32	13(40,6)	14(43,8)	6(18,8)	10(31,3)

B= bacteriúria sem leucocitúria e sem hematúria

BL+H=bacteriúria com intensa leucocitúria (>1.000.000/ml) com ou em hematúria.

Hly⁺= produção de hemolisina.($\chi^2=0,323$, GL=1, $p=0,569$)

tipo 1= expressão da fimbria tipo 1.($\chi^2=0,706$, GL=1 $p=0,400$)

CNF1⁺= produção do fator necrosante citotóxico.($\chi^2=1,567$, GL=1, $p=0,210$).

FP⁺= expressão da fimbria P.($\chi^2=5,357$, GL=1, $p=0,020$).

A análise estatística evidenciou que Hly⁺, expressão da fimbria tipo 1 e produção de CNF1 distribuem-se, igualmente, entre os dois grupos e que somente a expressão da fimbria P foi, significativamente, mais freqüente entre as amostras de *E.coli* isoladas de pacientes com intensa leucocitúria.

2- ANÁLISE DOS FATORES DE VIRULÊNCIA.

2.1. DEPENDÊNCIA ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS ISOLADAS DAS PACIENTES EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.

Partindo-se do fato de que um único fator de virulência pode não explicar os diferentes quadros clínicos, investigamos a dependência entre fatores de virulência das cepas de *E.coli* isoladas de pacientes em diferentes faixas etárias (Tabela 13)

TABELA 13- Dependência entre os fatores de virulência das cepas de *E.coli* isoladas de pacientes em 4 diferentes faixas etárias.

Associação entre 2	faixas etárias(anos)			
fatores de virulência	<30 n=59	<=49 n=118	>=50 n=41	>60 n=25
Hly X tipo 1	dep	dep	não	não
Hly X CNF1	dep	dep	dep	dep
Hly X FP	não	não	não	não
tipo1 X CNF1	dep	dep	não	não
tipo1 X FP	inv	inv	não	não
CNF1 X FP	não	não	não	não

dep= presença de dependência
não= ausência de dependência
inv= dependência inversa
n=número total de pacientes em estudo
análise estatística= ver anexo

Dependência direta significa que, a presença de um dos fatores implica na presença do outro e dependência inversa, que a presença de um dos fatores implica na ausência do outro.

A não dependência significa que, não existe correlação estatisticamente significativa entre os fatores de virulência.

A tabela 13 evidencia, também, que a dependência entre Hly⁺ e CNF1⁺ está presente em todas as idades.

Algumas dependências, presentes nas cepas isoladas das pacientes com idade inferior ou igual a 49 anos, não ocorrem nas mulheres mais idosas.

É interessante notar que a dependência inversa, observada na expressão das fimbrias tipo 1 e P , que aparece nas cepas isoladas de pacientes com idade inferior ou igual a 49 anos, não acontece entre as cepas isoladas de pacientes com idade superior ou igual a 50 anos.

Ainda de acordo com a Tabela 13, podemos definir um perfil fenotípico das amostras de *E. coli.*, dentre as pacientes com idade inferior ou igual a 49 anos:

as cepas tipo 1⁺ são Hly⁺, CNF1⁺ e FP⁻ ;

as cepas Hly⁺ são tipo 1⁺, CNF1⁺ e FP⁻;

as cepas CNF1⁺ são tipo 1⁺, Hly⁺ e FP⁻;

as cepas FP⁺ são tipo 1⁻ e não existe correlação com Hly e CNF1.

2.2.CORRELAÇÃO ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA

Foram analisadas as possíveis correlações entre os fatores de virulência, independentemente da idade ou quadro clínico laboratorial da paciente. Os resultados estão demonstrados na Tabela 14.

TABELA 14- Característica das cepas de *E.coli* produtoras de alfa-hemolisina.

fatores de virulência	nº positivas nº total	(%)
fimbria tipo 1	38/58	(65,5%)
CNF1 ⁺	37/58	(63,8%)
FP ⁺	18/58	(31,0%)
CNF1- produção do fator necrosante citotóxico		
FP ⁺ = expressão da fimbria P		

Das 58 cepas Hly⁺, 38 (65,5%) expressam fimbria tipo 1 e 37 (63,8%) produzem CNF1, porém, a expressão da fimbria P aparece em menor porcentagem, sendo mais prevalente entre o grupo de pacientes que tem BLH.

Na Tabela 15, mostramos as características das *E.coli* produtoras de CNF1.

TABELA 15- Característica das cepas de *E.coli* produtoras de CNF1

fatores de virulência	nº positivas nº total	(%)
Hly ⁺	37/41	(90,24%)
FP ⁺	4/41	(9,75%)
Hly ⁺ = produção da hemolisina		FP+= expressão da fimbria P

Podemos observar que, das 41 cepas CNF1⁺, 37 (90,2%) são também hemolíticas, e somente 4 expressam FP+. Na Tabela 16, avaliamos os fenótipos tóxicos das cepas isoladas de nossas pacientes.

TABELA 16- Incidência de *E.coli* com diferentes fenótipos tóxicos

fenótipos	n° positivas n° total	(%)
Hly ⁺ CNF1 ⁺	37/159	(23,27%)
Hly ⁺ CNF1 ⁻	21/159	(13,20%)
Hly ⁻ CNF1 ⁺	4/159	(2,51%)
Hly ⁻ CNF1 ⁻	97/159	(61,0%)

Hly= produção de hemolisina CNF1=produção do fator necrosante citotóxico

Dentre as pacientes com cistite, 97 (61%) não produzem nenhuma das 2 toxinas, o perfil Hly⁺ CNF1⁺ aparece somente em 37 (23,27%) das cepas, enquanto que 21 (13,20%) são cepas Hly⁺ CNF1⁻.

Na Tabela 17, avaliamos os fenótipos tóxicos somente das cepas que expressaram fimbria P.

TABELA 17- Característica das *E.coli* que expressam fimbria P

fenótipo tóxico	nº cepas=36(%)
Hly ⁺ CNF1 ⁺	4 (11,1)
Hly ⁺ CNF1 ⁻	14 (38,9)
Hly ⁻ CNF1 ⁺	0
HLY ⁻ CNF1 ⁻	18 (50,0)

Hly= produção da hemolisina
CNF1= produção do fator necrosante citotóxico

Podemos observar que 18 (50,0%) das cepas FP⁺ não produzem toxina, e que 18 são hemolíticas.

3 - DISTRIBUIÇÃO DOS SOROGRUPOS DE *E.coli* ISOLADAS NOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES.

A sorogrupagem das cepas de *E.coli* isoladas de pacientes com cistite mostrou a seguinte distribuição (Tabela 18).

TABELA 18- Distribuição dos sorogrupos de *E.coli* isoladas de pacientes com cistite, segundo o tipo de resposta do hospedeiro.

sorogrupo	grupo de pacientes			Total (%) n=159
das <i>E.coli</i>	BL n=67	BLH n=51	B n=41	
NT	16	4	12	32 (20,1)
O1	4	3	3	10 (6,3)
O2	1	7	1	9 (5,7)
O3		1		1
O4	1	2		3
O6	10	7	6	23 (14,5)
O7	2	5	4	11 (6,9)
O8		1	3	4
O9		1		1
O11		1		1
O12	2		1	3
O14	3	3	1	7 (4,4)
O15		1		1
O16	1			1
O18	4	2	2	8 (5,0)
O20			1	1
O21	1	2		3
O22	1	1	1	3
O23	1			1
O25		3	1	4
O26	1			1
O32	1			1
O33	1			1
O70		1		1
O73	1			1
O75	6	2	1	9 (5,7)
O81	2	1	1	4
O83	1	1		2
O92	1			1
O99	2			2
O111		1		1
O113	1			1
O114	1			1
O132	1	1		2
O141	1			1
O153			2	2
O159			1	1
O161	1			1
O169		1		1

NT= não tipável
BL= bacteriúria com leucocitúria
BLH=bacteriúria leucocitúria e hematúria
B =bacteriúria sem leucocitúria e sem hematúria
n= número de pacientes em estudo

Das 159 amostras isoladas, 32 (20,1%) são não tipáveis, e as 127 restantes distribuem-se por 38 sorogrupos, sendo que as mais freqüentes pertencem a 7 sorogrupos: O6, O7, O1, O2, O75, O18 e O14 respectivamente, representando 77 (48,43%) das cepas isoladas ou 60,6% das tipáveis.

É importante observar que, estes 7 sorogrupos foram mais freqüentemente identificados dentre as pacientes com leucocitúria acompanhada ou não de hematúria 59 (76,6%), que dentre as pacientes sem resposta inflamatória local 18 (23,4%). Na Tabela 19, analisamos os sorogrupos somente das amostras que expressaram fimbria P.

**TABELA 19- Sorogrupos das *E.coli*
que expressam fimbria P.**

Sorogrupos	nº de cepas
O1	4
O2	3
O6	2
O4	3
O7	9
O16	1
O18	4
O75	4
O12	1
O15	1
O21	2
NT	2

NT= não tipável

Podemos observar que os sorogrupos mais freqüentes O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 e O75, compreendem 30 (83,3%) das bactérias, prevalecendo o sorogrupo O7, isolado em 25% das cepas FP+.

TABELA 20- Características das cepas de *E.coli* do sorogrupo O6.

fatores de virulência	nº positivas	nºtotal (%)
Hly ⁺	18/23	(78,3%)
FP ⁺	2/23	(8,7%)
CNF1 ⁺	20/23	(87,0%)

Hly= produção de hemolisina

FP= expressão da fimbria P

CNF1=produção do fator necrosante citotóxico

Individualizando, na Tabela 20, todas as cepas de *E.coli*, do sorogrupo O6, e relacionando-as com os fatores de virulência, podemos observar um fenótipo tóxico, produzindo Hly e CNF1 e não um fenótipo de aderência.

4 - PESQUISA DA FÍMBRIA S

A expressão da fimbria S não foi detectada em nenhuma das 159 cepas estudadas.

5 - PESQUISA DA HEMAGLUTININA Dr

A expressão da hemaglutinina Dr foi detectada em apenas três (14,3%) das 21 cepas estudadas que, apresentam HMR+ com hemácias humanas do fenótipo P1+ e que não expressavam a fimbria P, sendo que, uma pertence ao sorogrupo O2, outra ao sorogrupo O18 e a terceira foi não tipável.

V - DISCUSSÃO

A presença da *E. coli* no interior da bexiga acarreta diferentes tipos de resposta inflamatória local, que podem ser medidos pela presença de leucócitos e hemácias na urina recém emitida.

Ao estudarmos como responde a mucosa vesical das 159 pacientes com cistite por *E.coli*, determinamos que existem três tipos de resposta do hospedeiro (Tabela 7). A bacteriúria com leucocitúria (BL) foi detectada em 67 (42,1%) das pacientes, e 51 (32,1%) evoluíram com bacteriúria leucocitúria e também com hematúria (BLH). Por outro lado, 41 (25,8%) das pacientes não apresentaram leucocitúria (B), evidenciando que existe um grupo de pacientes que pode cursar sem qualquer resposta inflamatória da mucosa vesical. Salientamos que todas as 41 pacientes sem leucocitúria evoluíram também sem hematúria, sugerindo que não há hematúria na ausência do processo inflamatório.

Focalizando esse fato, a partir do microrganismo, podemos inferir que, tanto é possível a existência de cepas que não estimulam a resposta do hospedeiro, quanto cepas que estimulam somente a leucocitúria. Há também outras cepas que, além de estimularem a leucocitúria, poderiam expressar algum outro fator de virulência, ainda não descrito, que as capacitaria a invadir a mucosa, à semelhança das cepas de *E. coli* invasoras do trato intestinal, e serem, assim, responsáveis pelo sangramento vesical. O fato de não terem sido detectadas, em nossa amostragem, pacientes que apresentassem hematúria, na ausência de leucocitúria, corrobora essa observação.

SVANBORG ÉDEN et al (1986), trabalhando com modelo animal, sugeriram que a inflamação da mucosa vesical é o grande fator de depuração bacteriana do rim, que o lipíde A é o maior indutor da resposta inflamatória, e que a capacidade de adesão à superfície mucosa potencializa a inflamação.

Tomando como base tais informações e focalizando a partir do hospedeiro, podemos inferir que as pacientes sem leucocitúria e/ou hematúria constituem um grupo incapaz de responder com leucocitúria ao estímulo do lipíde A das cepas de *E.coli*. Como a

depuração bacteriana da mucosa vesical é realizada pelos leucócitos, conceitualmente este grupo poderia representar uma categoria de hospedeiros incapazes de apresentar a resposta mucosa local.

Analisando a distribuição etária das pacientes dos três grupos (BL, BLH e B), podemos afirmar que a idade, nos dois grupos com leucocitúria, não é, significativamente, diferente, porém, o grupo sem leucocitúria e sem hematúria (B) é composto por mulheres significativamente mais idosas (Tabela 8).

Esse fato permite-nos sugerir que a ausência de leucocitúria pode apresentar correlação com a idade das pacientes, ou seja, as idosas tendem a não expressar resposta mucosa local. Associando-se esse fato às afirmações de SVANBORG ÉDEN et al (1986), podemos sugerir que a capacidade de responder ao estímulo do lipídeo A pode desaparecer com o avançar da idade. Cabe, também, a hipótese de que essas pacientes poderiam ser colonizadas por bactérias menos virulentas, que não suscitariam uma resposta vesical.

Posto que a idade pode influenciar a resposta do hospedeiro, passamos a analisá-la, em diferentes faixas etárias de pacientes, para detectarmos uma possível dependência frente a idade.

Inicialmente, tomamos como base os 50 anos e estudamos duas faixas etárias: pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos e pacientes com idade igual ou superior a 50 anos (Tabela 9). Observamos que não existe diferença significativa de idade entre as pacientes e que a distribuição dos quadros clínicos BL, BLH e B é homogênea.

A homogeneidade dos grupos possibilitou que investigássemos os fatores de virulência das cepas de *E.coli* nessas duas faixas etárias.

Dentre as pacientes com idade igual ou superior a 50 anos, a produção de hemolisina (Hly) foi detectada em 15 (36,6%) das cepas; a fimbria tipo 1, em 19 (46,3%); o fator necrosante citotóxico (CNF1), em 10 (24,4%) e a fimbria P, em somente 7 (17,1%) (Tabela 10). É relevante o fato de que a prevalência da fimbria P seja tão pequena, pois

DOMINGUE et al (1985) publicaram uma frequência de 34% em cistite e 38% em bacteriúria assintomática.

Podemos, então, sugerir que nenhum dos quatro fatores de virulência pesquisados, apresentou significância para explicar o quadro clínico-laboratorial de cistite.

Este fato foi confirmado ao analisarmos o grupo mais idoso, com idade superior a 60 anos, onde detectamos que nenhum dos quatro fatores apresentou dependência significativa para explicar o quadro clínico-laboratorial de cistite (dados não apresentados).

Em resumo, podemos afirmar que, nas pacientes mais idosas, os fatores de virulência pesquisados não são determinantes para explicar a resposta do hospedeiro, tanto do ponto de vista do fluxo de leucócitos para a mucosa vesical, quanto do aparecimento de hemácias.

Diferentemente, ao analisarmos as pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos (Tabela 11), observamos que os fatores Hly, fimbria tipo 1 e CNF1 apresentaram distribuição homogênea nos três grupos, porém, a expressão da fimbria P é significativamente mais frequente entre as amostras isoladas de pacientes com BL ou BLH. Resultados semelhantes foram obtidos analisando-se as pacientes com idade igual ou inferior a 30 anos (dados não apresentados).

Dentre as pacientes com idade inferior ou igual a 49 anos, a Hly foi detectada em 43 (36,4%) das cepas; a fimbria tipo 1, em 59 (50,0%); o CNF1, em 31 (26,3%) e a fimbria P, em 29 (24,6%).

A prevalência dos fatores Hly, fimbria tipo 1 e CNF1, foi semelhante nas faixas etárias igual ou inferior a 49 anos e superior ou igual a 50 anos, com exceção da fimbria P, detectada, mais frequentemente, entre as pacientes com menos de 49 anos.

Para confirmarmos a associação entre a expressão da fimbria P e a leucocitúria, passamos a analisar dois extremos da nossa amostragem (Tabela 12)

representados, de um lado, pelas pacientes do grupo B, e de outro, um novo grupo, composto por pacientes com bacteriúria e leucocitúria, acompanhada ou não por hematúria (BL+H), mas que evoluíram com intensa leucocitúria (contagem de leucócitos superior a 1.000.000/ml). Podemos sugerir que não existe correlação entre os fatores de virulência Hly, fimbria tipo 1 e CNF1 e a qualidade da resposta mucosa local do hospedeiro, no que diz respeito à presença de leucócitos. De maneira semelhante, a leucocitúria foi mais freqüente entre as pacientes cujas cepas expressaram a fimbria P.

Assim, os fatores Hly, fimbria tipo 1 e CNF1, não apresentam nenhuma correlação com a presença ou não de leucócitos e/ou hemácias, tampouco com a quantidade dessas células, em qualquer idade que a paciente apresente.

A correlação entre a leucocitúria e a expressão da fimbria P, que segundo KORHONEN et al (1990), adere preferencialmente ao endotélio e em menor proporção ao epitélio e à parede muscular da bexiga, permite-nos levantar a hipótese de que, essa fimbria poderia propiciar uma maior contigüidade entre a bactéria e o hospedeiro, potencializando, segundo SVANBORG ÉDEN et al (1986), sua resposta local. De maneira análoga, a inexistência de correlação entre a fimbria tipo 1 e a leucocitúria, pode ser explicada pelo fato de ela não aderir ao epitélio vesical, mas somente à parede muscular da bexiga e ao endotélio. Além disto, ORSKOV et al (1980) e CHICK et al (1981) comprovaram que a fimbria tipo 1 adere à proteína de Tamm-Horsfall e PARKKINEN et al (1988) comprovaram que, em concentrações urinárias normais, esta proteína inibe a adesão mediada pela fimbria tipo 1. Esse mecanismo é responsável pela eliminação das cepas de *E.coli* pelo fluxo urinário.

As cepas de *E.coli* produzem duas toxinas Hly⁺ e CNF1⁺ que poderiam relacionar-se com hematúria, porém, em nossa amostragem, não detectamos nenhuma associação entre esses fatores de virulência e a presença de hemácia na urina. De qualquer maneira, não é suficiente que a bactéria produza essas toxinas, pois elas seriam mais ativas

se mantivessem estreito contato com a mucosa, condição propiciada fundamentalmente por adesinas que, em nosso estudo, caracterizam-se somente pelas fimbrias P.

Essa observação coloca-nos frente à hipótese de que, a lesão tissular deve ser causada por uma associação entre os diferentes fatores de virulência, ou seja, deve-se à multifatoriedade biológica.

De acordo com KORHONEN et al (1985) e PARKKINEN et al (1988), apesar de a fimbria S aderir ao epitélio vesical, ao endotélio, à parede muscular e também ao tecido conjuntivo, adere também a receptores contidos na proteína de Tamm-Horsfall. Diferentemente do que foi descrito acima, a fimbria, nesse caso, pode propiciar a adesão ao epitélio vesical, porém, o hospedeiro possui o mesmo receptor de forma solúvel, no uromucóide, fazendo com que a bactéria, ao aderir a essa estrutura, seja eliminada pela urina.

Em nosso trabalho, não detectamos a fimbria S em nenhuma amostra de *E.coli*, fato, a nosso ver, revelador da pouca importância que essa adesina representa para as infecções do trato urinário baixo.

NOWICKI et al (1989), trabalhando com análise molecular, sugeriram que a hemaglutinina Dr, pudesse ser um fator de virulência para o trato urinário baixo, e assim identificaram a capacidade de expressar a hemaglutinina Dr nas cepas de *E.coli* de 25,7% das pacientes com cistite, de 27,6% das pacientes com ITU sintomática e em somente 6% daquelas com pielonefrite. Em nosso trabalho, estudamos sempre a expressão das fimbrias por métodos de aglutinação, e detectamos somente 3 (14,3%) cepas que expressavam a hemaglutinina Dr, dentre as 21 cepas manose resistentes (HMR^+) que não expressavam fimbria P. Apesar de não termos determinado a prevalência da hemaglutinina Dr, em nossa amostragem, é importante salientar que as técnicas moleculares detectam a capacidade de expressão da fimbria e não sua real presença.

A análise dos fatores de virulência de *E.coli*, apresentados na Tabela 13, evidencia que existe um grau de dependência entre a expressão ou produção desses fatores e que esse fato, uma vez mais, varia com a idade das pacientes.

A presença da dependência entre Hly e fimbria tipo 1 e desta fimbria com CNF1 aparece, somente, entre as cepas isoladas de pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos. Isso significa que, a produção da hemolisina ocorre juntamente com a expressão da fimbria tipo 1 e que esta aparece juntamente com o fator necrosante citotóxico.

Somando-se a isso podemos observar, também na Tabela 13, que na mesma faixa etária existe uma tendência inversa na expressão das fimbrias tipo 1 e P. Podemos então supor que as cepas de *E.coli*, isoladas das pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos, apresentam um fenótipo fimbria tipo 1⁺, Hly⁺, CNF1⁺ e FP⁻. Este fenótipo é toxigênico, não possibilita a aderência ao epitélio vesical, porém, a fimbria tipo 1 confere capacidade de aderir aos polimorfonucleares (PMN) e, assim, intermediar a fagocitose.

A dependência na produção das Hly e CNF1 foi detectada nas cepas bacterianas isoladas de todas as pacientes, não sendo, portanto, influenciada pela idade. Nossos dados estão de acordo com aqueles de CAPRIOLI et al (1987), que foram os primeiros a descrever uma clara associação entre a produção da alfa hemolisina e CNF1, e que criaram dois grupos de cepas hemolíticas: Hly⁺ CNF⁺ e Hly⁺ CNF⁻. Pode ser que a associação entre Hly e CNF1 possa ser explicada por uma possível afinidade entre os genes que codificam para as duas toxinas, e isto possibilite algum tipo de relação.

A inexistência de dependência entre a produção de Hly e a expressão da fimbria P foi comum entre as cepas de *E.coli* isoladas de pacientes de todas as idades, estudadas neste trabalho. Por um lado, de acordo com VÄISÄNEN-RHEN et al (1984) a presença de cepas hemolíticas é mais freqüente nas pielonefrites e essa toxina pode ser responsável pela lesão tissular; por outro, a expressão da fimbria P é característica importante para uma cepa ascender pelo ureter. DOMINGUE et al (1985) e JACOBSON et

al (1985) detectaram-na em 100% e 90%, respectivamente, das cepas isoladas de pielonefrites em adultos e KÄLLENIUS et al (1981a) demonstraram a fimbria P em 91% de crianças com pielonefrite. Entretanto, em nossos trabalhos não detectamos a associação entre Hly e a fimbria P. (Tabela 13)

Apesar da não dependência na expressão dos fatores de virulência Hly⁺ e FP⁺, existente entre as nossas pacientes, podemos afirmar que dentre as 36 cepas FP⁺, 16 (44,4%) produzem Hly⁺ (Tabela 19). Dessa maneira, estão presentes, na bexiga, cepas capazes de ascender pelo trato urinário e causar pielonefrite. Além disso, essas 16 amostras de *E.coli* correspondem a 10,06% de nossa amostragem, fato que está de acordo com a prática médica, onde observamos que a prevalência de cistite é muito maior que a de pielonefrite.

Como podemos observar na Tabela 13, dentre as mulheres com idade superior ou igual a 50 anos, não existe dependência entre os fatores de virulência das cepas de *E.coli*, com exceção de Hly⁺ e CNF1⁺, o que impede a caracterização de um perfil fenotípico das cepas de *E.coli* nessas pacientes.

Podemos sugerir que, nessas pacientes, a mucosa vesical pode responder com leucocitúria com ou sem hematúria, ou não apresentar qualquer resposta inflamatória. Além disso, as cepas de *E.coli* não necessitam expressar associação entre os fatores de virulência para causar o quadro clínico laboratorial de cistite, podendo ser infectadas por cepas de menor patogenicidade, contrariamente ao observado no perfil fenotípico das cepas isoladas de pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos.

Discutindo epidemiologicamente a expressão dos fatores de virulência durante a ITU, JOHNSON (1991) relata que a expressão da fimbria P declina progressivamente de 70% entre as cepas isoladas de pacientes com pielonefrite, para 36% entre as isoladas de pacientes com cistite, 24% entre as isoladas de pacientes com bacteriúria assintomática e 19% entre as amostras fecais. DOMINGUE et al (1985) determinaram que a frequência da fimbria P foi de 34% em cistite e 38% em bacteriúria assintomática. Nós

trabalhamos somente com cepas isoladas de pacientes com cistite sintomática, em duas diferentes faixas etárias e detectamos (Tabelas 10 e 11) a fimbria P em 17,1% das amostras das pacientes com idade superior a 50 anos e 24,6% entre as cepas isoladas das pacientes com idade inferior ou igual a 49 anos, sendo que, somente nessas pacientes, existe correlação com a presença de leucocitúria e/ou hematúria.

Nossos dados demonstram que a expressão da fimbria P pode variar com a idade da paciente, sendo mais freqüente entre aquelas com idade inferior a 49 anos. Porém, o que chama mais atenção é o fato de existir uma dependência inversa entre a expressão da fimbria P e da tipo 1 (Tabela 13), que aparece somente nessas pacientes. Assim, as cepas de *E.coli* isoladas de pacientes mais novas apresentam um perfil de expressão da fimbria P e não expressão da tipo 1.

Nós levantamos a hipótese de que esse fenótipo de *E.coli* apresenta uma dupla vantagem, ou seja, expressa a fimbria P que, de acordo com KORHONEN et al (1988) a capacita a ascender pelo trato urinário e não expressa a fimbria tipo 1, que segundo SVANBORG ÉDEN et al (1984), propicia o reconhecimento bacteriano e, dessa maneira foge da defesa do hospedeiro, principalmente da fagocitose, pois os PMN apresentam, em sua superfície, somente receptores para a fimbria tipo 1.

Dessa maneira, nosso trabalho detecta que, na bexiga das pacientes com idade inferior ou igual a 49 anos, existem cepas que apresentam adaptação biológica ou fenótipo necessário, que as capacita a ascender pelo ureter e chegar a pelve renal.

A produção da alfa hemolisina por cepas de *E.coli* pode não ser um fator de virulência para patologias do trato urinário baixo, segundo VÄISÄNEN RHEN et al (1984), porém, em nosso trabalho, detectamos que as cepas Hly⁺ expressaram fimbria tipo 1 em 38 (65,5%), produziram o fator necrosante citotóxico em 37 (63,8%) e expressaram a fimbria P em 18 (31,0%) .Tabela 14).

Analisando as *E.coli* CNF1⁺ determinamos que essa toxina foi produzida por 41 (25,8%) das cepas isoladas das pacientes com cistite, e como CAPRIOLI et al (1987) e (1989) encontramos uma clara associação entre CNF1⁺ e a alfa hemolisina 37 (90,24%), porém a associação entre CNF⁺ e FP⁺ foi detectada em somente 4 (9,75%) das cepas (Tabela 15).

Na Tabela 16, apresentamos os fenótipos tóxicos propostos por CAPRIOLI et al (1987), e evidenciamos que, em nossa amostragem, 97 (61%) das cepas isoladas apresentaram o fenótipo Hly⁻ CNF1⁻ e que 37 (23,27%) das cepas produziram as duas toxinas, constituindo o fenótipo Hly⁺ CNF1⁺.

Analisando as *E.coli* FP⁺, determinamos que essa fimbria foi expressa por 36 (22,6%) das cepas isoladas de nossas pacientes e verificando seus perfis toxigênicos, na Tabela 17, observamos que 18 (50,0%) são Hly⁺ e destas, 4 (11,1%) são Hly⁺ CNF1⁺. Por outro lado, 18 (50,0%) das cepas não apresentam toxigenicidade, caracterizando-se por serem Hly⁻ CNF1⁻. BLANCO et al (1992), descreveram esses perfis toxigênicos, dentre cepas isoladas de bacteriemia e de infecções urinárias, obtendo, dentre as FP⁺ 65% de Hly⁺ e 38% de CNF⁺.

Dentre as 159 pacientes com cistite, o sorogrupo O6 foi o mais freqüente, seguido pelos sorogrupos O7,O1,O2,O75,O18 e O14, respectivamente.(Tabela 18).

Quando correlacionamos com o quadro clínico laboratorial, observamos que as pacientes com leucocitúria com ou sem hematúria, apresentam uma maior prevalência dos sorogrupos mais freqüentes que o grupo de pacientes com bacteriúria sem leucocitúria. Chama, também, a atenção o número elevado de cepas não tipáveis 32 (20,1%) (Tabela 18).

Estudando os sorogrupos das *E.coli* FP⁺ apresentados na Tabela 19, podemos observar que os sorogrupos O1,O2,O4,O6,O7,O16,O18 e O75 representam

83,3% das cepas FP^{+} , sendo que, nessas cepas, o antígeno O7 é o mais freqüente. Esse fato é importante, pois de acordo com ORSKOV & ORSKOV (1983) estes sorogrupos representam 80% das cepas pielonifretogênicas. Dessa maneira, temos na bexiga, cepas com dupla adaptação biológica, semelhante ao fenótipo das cepas isoladas do trato urinário alto.

Na Tabela 20, colocamos os fatores de virulência das cepas do sorogrupo O6 e podemos observar que 18 (78,3%) são Hly^{+} , 20 (87%) são CNF^{+} e 2 (8,7%) expressam FP^{+} . Dessa maneira, fica claro que o sorogrupo mais freqüente, isolado de nossas pacientes, apresenta fundamentalmente um fenótipo toxigênico e pouca capacidade de aderência.

CONCLUSÕES

1- As pacientes com cistite sintomática podem apresentar 3 tipos de resposta mucosa local frente a bacteriúria por *E.coli*. Assim, analisando a partir das características bacterianas, existem cepas que se relacionam somente a leucocitúria, cepas que se relacionam a leucocitúria e hematúria e, também, aquelas que não estimulam a resposta do hospedeiro.

2- A idade influenciou a resposta mucosa local, pois detectamos que as pacientes com bacteriúria sem leucocitúria e hematúrias são significativamente mais idosas.

3-O quadro clínico-laboratorial dos três grupos de pacientes, em qualquer idade, não tem relação com os fatores de virulência de *E.coli*: fimbria tipo 1, hemolisina e CNF1.

4-A expressão da fimbria P foi mais freqüente somente entre as pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos, dos grupos com leucocitúria com ou sem hematúria.

5-Os fatores de virulência das cepas de *E.coli* apresentam dependência direta e inversa, em sua produção ou expresso, que varia com a idade das pacientes, tendo sido observada somente nas pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos.

6- As *E.coli* isoladas das pacientes com idade igual ou inferior a 49 anos apresentam o seguinte fenótipo: tipo 1⁺, Hly⁺, CNF1⁺ e FP⁻ e as FP⁺ são tipo 1⁻. Contrariamente, não foi possível determinar um fenótipo dentre as pacientes com idade igual ou superior a 50 anos.

7-O fenótipo tóxico Hly⁺ CNF1⁺ foi detectado em 37 (23,27%) das cepas de *E.coli*, porém, a maioria não produz nenhuma toxina, caracterizando o fenótipo Hly⁻ CNF1⁻.

8-O sorogrupo O6 foi o mais freqüente dentre as 159 cepas de *E.coli* estudadas, porém, entre as cepas que expressaram a fimbria P, o sorogrupo O7 foi o mais freqüente.

8-O sorogrupo O6 foi o mais freqüente dentre as 159 cepas de *E.coli* estudadas, porém, entre as cepas que expressaram a fimbria P, o sorogrupo O7 foi o mais freqüente.

9- Dentre as cepas de *E.coli*, que expressam a fimbria P, os sorogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 e O75 representam 83,3%, e caracterizam-se por um perfil fenotípico das cepas isoladas de pielonefrite ou seja, dupla adaptação biológica.

10- Nenhuma cepa com fimbria S foi detectada dentre as *E.coli* estudadas.

11- A hemaglutinina Dr foi detectada em somente 3 cepas das *E. coli* pesquisadas, sendo que nenhuma delas era do sorogrupo O75.

SUMMARY

This study investigated the correlation between the local mucosal response and the virulence factors of Escherichia coli strains isolated from the urine of 159 female patients with clinical symptoms of acute cystitis. Based on clinical analyses the patients had either leukocyturia (BL), leukocyturia and hematuria (BLH) or no of leukocyturia (B). The virulence factors studied in the E.coli strains isolated include the expression of types 1, P and S fimbriae and of Dr hemagglutinin as well as the production of hemolysin (Hly) and cytotoxic necrotizing factor (CNF1). None of the E.coli strains had S fimbriae and Dr hemagglutinin was detected in only three, out of 21 strains tested. The presence of strains expressing type 1 fimbriae and producing cytotoxins (Hly and CNF1) was not correlated with the local mucosal response. E.coli strains with P fimbriae were most frequently observed in patients up to 49 years old. These individuals also had leukocyturia. The absence of a clinical vesical response was more prevalent in patients more than 50 years old. There was not always a direct correlation between the presence of the different themselves such that the expression of one factor did not necessarily imply that of a second. This relationship also depended on the patient's age thereby allowing us to classify those up to 49 years old as having the following phenotype: type 1 fimbria⁺; Hly⁺; CNF1⁺ and P fimbria⁻. Of the hemolytic E.coli strains (Hly⁺), 63,8% were CNF1⁺ while in the CNF1⁺ strains, 90,2% were Hly⁺. Fifty percent of the strains with P fimbria, were also hemolytic. The most common serogroup was O6. In the P fimbriae positive strains 83,3% belonged to one of the eight most prevalent serogroups presenting in the urinary tract infections of these, serogroup O7 was the most common.

V. BIBLIOGRAFIA

- ADEGBOLA,R.A.& OLD,D.C.. Antigenic relationships among type-1 fimbriae of Enterobacteriaceae revealed by immuno-electromicroscopy. **J. Med.Microbiol.**, **24**:21-28,1987.
- BLANCO,J.; BLANCO,M.; GONZÁLES,E.A.; ALONSO,M.P.; GARABAL,J.I.. Comparative evaluation of three tests for detection of Escherichia colic citotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomicin C. **FEMS Microbiol., Letters** **69**:311-316, 1990.
- BLANCO,J.; BLANCO,M.; ALONSO,M.P.; GARABAL,J.I.; BLANCO,J.E.; GONZÁLEZ,E.A.. Factores de virulencia de los Escherichia coli causantes de infecciones extraintestinales. **Monografias da Universidade de Compostela nº 170**,87-90,1992.
- BRAN,J.L.; LEVISON,M.E.; KAYE,D. Entrance of bacteria into the female urinary bladder. **N.Engl J.Med.**, **286**:626,1972
- BRINTON Jr,C.C. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model of DNA and RNA transport in gram negative bacteria. **Trans.NY. Acad. Sci.**, **27**:1003-1054,1965.
- BUCKLEY,R.M.; McGUICKIN,M.; MacGREGOR,R.R.:Urine bacterial count following sexual intercourse. **N.Engl.J.Med.**,**298**:321-324,1978
- CAPRIOLI,A.;FALVO,V.;RODA,L.G.;RUGGERI,F.M.; ZONA,C..Partial purification and characterization of an Escherichia coli toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infect. Immun.**, **39**:1300-1306,1983.
- CAPRIOLI,A.; DONELLI,G.; FALO,V.; POSSENTI,R.; RODA, L.G.; ROSCETTI, G.; RUGGERI,F.M.. A cell-division active protein from Escherichia coli. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **118**:587-593,1984.

- CAPRIOLI,A.; FALVO,V.; RUGGERI,F.M.; BALDASSARI,L.; BISICCHIA,R.; IPPOLITO,G.; ROMOLI,E.; DONELLI,G.. Cytotoxic necrotic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **J.Clin. Microbiol.**, **25**:146-149,1987.
- CAPRIOLI,A.; FALBO,V.; RUGGERI,F.M.; MINELLI,P.; ORSKOV I.; DONELLI,G. Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in hemolytic *Escherichia coli*. **J.Clin Microbiol.**, **27**:758-761,1989.
- CARBONETTI, N.H.; BOONCHI,S; PARRY,S.H.; VÄISÄNEN-RHEN,V; KORHONEN, T.K e WILLIAMS,P.H.. Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. **Infect. Immun.**, **51**:966-968,1986.
- CHAN, R.C.Y.; REND, G.; IRVIN, R.T.. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells wall and cell fragments. **Infect. Immun.**, **47**: 84-89,1985.
- CHICK S.; HARBER,M.J.; MACKENZIE,R.;ASSCHER, A. W. . Modified method for studying bacterial adhesion to isolated uroepithelial cells and uromucoid. **Infect. Immun.**, **34**:256-261,1981.
- COX,C.E.; LUCY,S.S.; HINNAM,F.JR.. The urethra and its relationship to urinary tract infection. II. The urethral flora of the female with recurrent urinary infection. **J.Urol.**, **99**: 632-635,1968.
- CROSS,A.S.; GEMSKLP.; SADOFF,J.C.; ORSKOV,I. The importance of the K₁ capsule in invasive infections caused by *Escherichia coli*. **J.Infect.Dis.**, **149**:184-193, 1984.

- CZIRÓK,E. Virulence factors of *E.coli*. II. Antigens O4 , O6 and O18, haemolysin production and mannose resistant haemagglutinating capacity are closely associated. **Acta.Microbiol.Hung.**, **32**:183-192,1985.
- DAIFUKU,R. & STAMM W.E.: Association of retal and urethral colonization with urinary tract infection in patients with indwelling catheters. **JAMA** **252**: 2028-2030,1984
- de REE,J.M. & van den BOSCH,J.F.Fimbrial serotypes of *E.coli* strains isolated from extra-intestinal infections.**J. Med. Microbiol.**, **29**:95-99,1989.
- DE RYCKE,J.;GUILLOT,J.F.; BOIVIN,R. Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *E.coli* isolated from feces of diarrheic calves.**Vet. Microbiol.**, **15**:137-150,1987.
- DE RYCKE, J.; PHAN-THANTH, L. ; BERNARD, S.: Immunochemical identification and biological characterization of cytotoxic necrotizing factor from *E.coli*. **J. Clin. Microbiol.**, **27**:983-988,1989.
- DE RYCKE,J.; GONZÁLEZ,E.A.; BLANCO,J.;OSWALD,E.; BLANCO,M.;BOIVIN,R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *E.coli*. **J. Clin. Microbiol.**, **28**:694-699,1990.
- DOMINGUE,G.J.; ROBERTS,J.A.; LAUCIRICA,R.; RATNER, M.H.; BELL,D.P.; SUAREZ,G.M.; KÄLLENIUS,G.; SVENSON,S. Pathogenic significance of P-fimbriated *E.coli* in urinary tract infections. **J. Urol.**, **133**:983-989,1985.
- DUGUID,J.P. & GILLIES,R.R. Fimbriae and adhesive properties of dysentery bacilli. **J. Pathol. Bacteriol.**, **74**:397-411,1957.
- DUGUID,J.P.; CLEAGG,S.;WILSON,M.L.The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *E.coli* **J. Med. Microbiol.**, **12**:213-227,1979.

- DUNCAN,J.L. Differential effect of Tamm-Horsfall protein on adherence of *E.coli* to transitional epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, **158**:1378-1381,1988.
- EISENSTEIN,B.I. Phase variation of type -1 fimbriae in *E.coli* is undertranscriptional control.**Science** **214**:337-339,1981.
- EVANS Jr,D.J.; EVANS,D.G.; DUPONT,H.L.: Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *E.coli* determited with human,bovine,chicken and guinea pig erythrocytes in presence and absence of mannose.**Infect.Immun.**, **23**:336-346,1979.
- EVANS Jr,D.J.; EVANS,D.G.; CLEGG,S.Lethality of bacteremia-associated *E.coli* for mice in relatin to serotype and hemagglutination (HA)-type.**FEMS Microbiol. Lett.**, **9**:171-174,1980a.
- EVANS Jr,D.J.; EVANS,D.G.; YOUNG,L.S.; PITT,J. Hemagglutination typing of *E.coli*: definition of seven hemagglutination types. **J. Clin. Microbiol.**, **12**:235-242,1980b.
- EVANS Jr,D.J.;EVANS,D.G.; HÖHNE,C.; NOBLE,M.A.; HALDANE,E.V.; LIOR,H.; YOUNG,L.S. Hemolysin and antigens in relation to serotype and hemagglutination type *E.coli* isolated from rxtraintestinal infections. **J. Clin. Microbiol.**, **13**:171-178, 1981.
- FOWLER,J.E.& STAMEY,T.A. Studies of introital colonization in women with recurrent infections VII. The role of bacterial adherence. **J. Urol.**, **117**:472- ,1977.
- FUJITA,K.; YAMAMOTO,T.; YOKOTA,T.; KITAGAWA,R.In vitro adherence of type 1-fimbriated uropathogenic *E.coli* to human ureteral mucosa. **Infect. Immun.**, **57**:2574-2579,1989.

- GAASTRA,W. & de GRAAF,F.K. Host-specific fimbrial adhesins of non invasive enterotoxigenic E.coli strains. **Microbiol. Rev.**, **46**:129-161,1982.
- GADEBERG,O.V. & LARSEN,S.O. In vitro cytotoxic effect of alpha-hemolytic E.coli on human blood granulocytes.**APMIS.**, **96**:337-341,1988.
- GADEBERG,O.V.; HACKER,J.; ORSKOV,I.Role of alpha-hemolysin for the in vitro phagocytosis and intracellular killing of E.coli. **Int J. Med. Microbiol.**, **271**:205-213,1989.
- GADÓ,I.; MILCH,H.; CZIRÓK,E.; HERPAY,M.The frequency of aerobactin production and its effect on the pathogenicity of human E coli strains. **Acta. Microbiol. Hung.**, **36**:51-60,1989.
- GLYNN,A.A. & HOWARD,C.J. The sensitivity to complement of strains of E.coli related to their K antigens.**Immunology** **18**:331-346,1970.
- GONZÁLEZ,E.A. & BLANCO,J.Propiedades de los E.coli causantes de diarrea en seres humanos. E.coli enterotoxigénicos (ETEC) y enteropatógenos clásicos (EPEC) y enteroinvasivos (EIEC).**Monografía nº 27 de la Universidad de Santiago de Compostela**,1987.
- GONZÁLEZ,E.A. & BLANCO,J.Serotypes and antibiotic resistance of verotoxigenic (VTEC) and necrotizing (NTEC) E.coli strains isolated from calves with diarrhoea.**FEMS Microbiol. Lett.**, **60**:31-36,1989.
- GREEN,C.P. & THOMAS,V.L. Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production and serogrouping of E.coli isolates from patients with acute pyelonephritis cystitis and asymptomatic bacteriuria. **Infect. Immun.**, **31**:309-315,1981.

- GRÜNBERG,J.; PERRY,R.; HOSCHÜTZKY,H.; JANN,B.; JANN,K.; GOLDHAR,J.
Nonfimbrial blood group N-specific adhesin (NFA-3) from *E.coli* O20:KX104:H-,
causing systemic infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, **56**:241-246,1988.
- HAGBERG,L.; JODAL,U.; KORHONEN,T.K.; LIDIN-JANSON,G.; LINDBERG,U.;
SVANBORG-EDÉN,C. Adhesion haemagglutination and virulence of *E.coli* causing
urinary tract infections. **Infect.Immun.**, **31**:564-570,1981.
- HAGBERG,L.; HULL,R.; HULL,S.; MCGHEE J.R.; MICHALEK,S.M.; SVANBORG-
EDÉN,C. Difference in susceptibility to Gram-negative urinary tract infection between
C3H/HeN mice. **Infect. Immun.**, **46**:839-844,1984.
- HARBER,M.J. Bacterial adherence. **Eur J. Clin. Microbiol.**, **4**:257-261,1985.
- HINMAN F.Jr.:Mechanisms for the entry of bacteria and the establishment of urinary
infection in female children. **J.Urol.**, **96**:546-550,1966.
- HOPKINS,W.J.; JENSEN,J.L.; UEHLING,D.T.; BALISH,E. In vitro and in vivo
adherence of uropathogenic *E.coli* strains. **J. Urol.**, **135**:1319-1321,1986.
- HOSCHÜTZKY,H.; NIMMICH,W.; LOTTSPEICH,F.JANN,K. Isolation and
characterization of the non-fimbrial adhesin NFA-4 from uropathogenic *E coli*
O7:K98:H6. **Microb.Path.**, **6**:351-359,1989.
- HUGHES,C.; PHILLIPS,R.; ROBERTS,A.P. Serum resistance among *E.coli* strains
causing urinary tract infection in related O type and the carriage of hemolysin,colicin
and antibiotic resistance determinants. **Infect. Immun.**, **35**:270-275,1982.
- HUGHES,C.; HACKER,J.; ROBERTS,A.; GOEBEL,W. Hemolysin production as a
virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by
E.coli. **Infect. Immun.**, **39**:546-551,1983.

- JACOBSON,S.H.; LINS,L.-E.; SVENSON,S.B.; KÄLLENIUS G. P-fimbriated *E.coli* in adults with acute pyelonephritis.(letter) **J. Infect. Dis.**, **152**:426-427,1985.
- JACOBSON,S.H.; HAMMARLIND,M.; LIDEFELDT,K.J.; ÖSTERBERG,E.; TULLUS,K.; BRAUNER,A. Incidence of aerobactin-positive *E.coli* strains in patients with symptomatic urinary tract infection. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **7**:630-634,1988.
- JOHNSON,C.C.: Definitions,classification and clinical presentation of urinary tract infections. **Med. Clin. North. Am.**, **75**:241-252,1991
- KAUSER,B.; HANSON,L.A.; JODAL,U.; LIDIN-JANSON,G.ROBBINS,J.B. Frequency of *E.coli* K antigens in urinary-tract infections in children. **Lancet I**:663-664,1977.
- KÄLLENIUS, G.; WINBERG, J.. Bacterial adherence to periurethral cells in girls prone to urinary tract infections. **Lancet II**: 540-543,1978.
- KÄLLENIUS,G. & MÖLLBY,R. Adhesion of *E.coli* to human periurethral cells correlated to mannose-resitant agglutination of human erythrocytes.**FEMS Microbiol. Lett.**, **5**: 295-299,1979.
- KÄLLENIUS,G.; MÖLLBY,R.; HULTBERG,H.SVENSON,S.B.; CEDERGREN,B.; WINBERG,J. Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *E.coli*. **Lancet II**:604-606,1981a.
- KÄLLENIUS,G.;MÖLLBY,R.;SVENSON,S.B.HELIN,I.;HULTBERG,H.;CEDERGREN, B.; WINBERG,J. Occurrence of P-fimbriated *E.coli* in urinary tract infections. **Lancet II**:1369-1372,1981b.

- KELSEY,M.C.; MEAD,M.G.; GRUNEBERG,R.N. et al: Relationship between sexual intercourse and urinary tract infection in women attending a clinic for sexually transmitted diseases.**J.Med. Microbiol.**, 12:511- 516, 1979.
- KÉTYI,I.; NAUMANN,G.; NIMMICH,W. Urinary tract infectivity of R strains of *E.coli* carrying various virulence factors.**Acta. Microbiol. Hung.**, 30:155-161,1983.
- KIM,K.S.; KANG,J.H.;CROSS,A.S.The role of capsular antigens in serum resistance and in vivo virulence of *E.coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 35:275-278,1986.
- KINANE,D.F.; BLACKWELL,C.C.; BRETTLE,R.P. ABO blood group, secretor state and susceptibility to recurrent urinary tract infection in women. **Br. Med. J.**, 285:7 ,1982.
- KISIELIUS,P.V.; SCHWAN,W.R.; AMUNDSEN,S.K.; DUNCAN,J.L.; SCHAEFFER, A.F. In vivo expression and variation of *E.coli* type 1 and P pili in the urine of adults with acute urinary tract infections.**Infect. Immun.**, 57:1656-1662,1989.
- KLEMM,P. Fimbrial adhesins of *E.coli*. **Rev. Infect. Dis.**, 7:321-340,1985.
- KORHONEN,T.K.; LEFFLER,H.; SVANBORG-EDÉN,C. Binding specificity of pilliated strains of *E.coli* and *Salmonella tythimurium* to epithelial cells, *Saccharomyces cerevisiae* and erythrocytes. **Infect. Immun.**, 32:786-804,1981.
- KORHONEN,T.K.; VÄISÄNEN,V.; SAXÉN,H.; HULTBERG,H.; SVENSON,S.B. P-antigen recognizing fimbriae from human uropathogenic *E.coli* strains.**Infect. Immun.**, 37:286-291,1982.
- KORHONEN,T.K.; VÄISÄNEN-RHEN,V.; RHEN,M.; PERE,A.; PARKKINEN,J.; FINNE,J. *E.coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. **J. Bacteriol.**, 159:762-766,1984.

- KORHONEN, T.K.; VALTONEN, M.V.; PARKKINEN, J.; VAISÄNEN-RHEN, V.; FINNE, J.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; SVENSON, S.B.; MÄKELÄ, P.H. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. **Infect. Immun.**, **48**: 486-491, 1985.
- KORHONEN, T.K.; VIRKOLA, R.; WETERLUND, B.; TARKKANEN, A.M.; LÄHTEENMÄKI, K.; SARENEVA, T.; PARKKINEN, J.; KUULSELA, P.; HOLTTHÖFER, H. Tissue interactions of *E. coli* adhesins. **Antonie van Leeuwenhoek** **54**: 411-420, 1988.
- KORHONEN, T.K.; VIRKOLA, R.; WESTURLUND, B.; HOLTTHÖFER, H.; PARKKINEN, J. Tissue tropism of *Escherichia coli* adhesins in human extraintestinal infections. **Curr. Top. Microbiol. and Immunol.**, **151**: 115-127, 1990.
- LEFFLER, H. & SVANBORG-EDÉN, C. Glycolipid receptors for uropathogenic *E. coli* human erythrocytes and uroepithelial cells. **Infect. Immun.**, **34**: 920-929, 1981.
- LEYING, H.; SUERBAUM, S.; KROLL, H.P. The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **58**: 222-227, 1990.
- LIDIN-JANSON, G.; HANSON, L.A.; KAUJER, B.: Compararison of *Escherichia coli* from bacteriuric patientes with those from faeces of healthy school children. **J. Infect. Dis.**, **136**: 346- , 1977.
- LINDERBERG, U.; HANSON, L.A.; JODAL, U.; LIDIN-JANSON, G.; LINCON, K.; OLLING, S. Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls. II. Differences in *E. coli* causing asymptomatic and symptomatic bactereuria. **Acta. Paediatr. Scand.**, **64**: 432-436, 1975.

- LOMBERG,H.; HANSON,L.A.; JACOBSSON,B.; JODAL,U.; LEFFLER,H.;EDEN,C.S..
Correlation of P blood group, vesicoureteral reflux, and bacterial attachment in
patients with recurrent pyelonephritis.**N.Engl. J.Med.**, **308**:1189-1192,1983.
- LOW,D.; DAVID,V.; LARK,D.; SCHOOLNIK,G.; FALKOW,S. Gene clusters governing
the production of hemolysin and mannose-resistant hemagglutination are closely linked
in *E.coli* serotype O4 and O6 isolates from urinary tract infections.**Infect. Immun.**,
43:353-358,1984.
- LUND,B.; MARKLUND,B.I.; STRÖMBERG,N.; LINDBERG,F.; KARLSSON,K.A.;
NORMARK,S. Uropathogenic *E.coli* can express serologically identical pili of
different receptor binding specificities.**Mol. Microbiol.**, **2**:225-263,1988.
- MABECK,C.E.;ORSKOV,F.;ORSKOV,I. *E.coli* serotypes and renal involvement in urinary
tract infection.**Lancet** I:1312-1314,1971.
- MARGET,W.& MAR, P.J..What is the role of lipid A in the development of pyelonephritis?
A hypothesis. **Scand. J .Urol. Nephrol.**, **104**:93-96,1987.
- McCABE,W.R.; KAUSER,B.; OLLING,J.; UWAYDAH,M.; HANSON,L.A. *E.coli* in
bacteremia:K and O antigens and serum sensitivity of strains from adults and neonates.
J. Infect. Dis.,**138**:33-41,1978.
- MEASLEY Jr,R.E.& LEVINSON,M.E.: Host defense mechanisms in the pathogenesis of
urinary tract infection. **Med. Clin. North. Am.**, **75**:275-286,1991
- MOBLEY,H.L.; CHIPPENDALE,G.R.; TENNEY,J.H.; HULL, R.A.; WARREN,J.W.
Expression of type 1 fimbriae may be required for persistence of *E.coli* in the
catheterized urinary tract. **J. Clin. Microbiol.**, **25**:2253-2257,1987.

- MOBLEY,H.L.; GREEN,D.M.; TRIFILLIS,A.L.; JOHNSON, D.E.; CHIPPENDALE, G.R.; LOCKATELL,C.V.;LONES,B.D.; WARREN, J.W. Pyelonephritogenic *E.coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells:role of hemolysin in some strains. **Infect. Immun.**, **58**:1281-1289,1990.
- MÖLLBY,R.; KÄLLENUS,G.; KORHONEN,T.K.; WINBERG,J.; SVENSON,S.B. P-fimbriae of pyelonephritogenic *E.coli* : detection in clinical material by a rapid receptor-specific agglutination test. **Infection** **11**:68-72,1983.
- MONTGOMERIE,J.Z.; BINDEREIF,A.; NEILANDS,J.B.; KALMANSON,G.M.; GUZE,L.B. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *E.coli* isolated from patients with bacteremia. **Infect. Immun.**, **46**:835-838,1984.
- NIMMICH,W.; ZINGLER,G.; ORSKOV,I. Fimbrial antigens of *E.coli* O1:K1:H7 and O1:K1:H strains isolated from patients with urinary tract infections.**Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A**, **258**:104-111,1984.
- NOWICKI, B.; VUOPIO-VARKILA, J.; VILJANEN, P.; KORHONEN, T.K.; MÄKELÄ, P.H. Fimbrial phase variation and systemic *E.coli* infection studied in the mouse peritonitis model. **Microb. Pathogen.**, **1**:335-347,1986.
- NOWICKI,B.; MOULDS,J.; HULL,R.; HULL,S. A hemagglutinin of uropathogenic *E.coli* recognizes the Dr blood group antigen.**Infect. Immun.**, **56**:1057-1060,1988.
- NOWICKI,B.; SVANBORG-EDÉN,C.; HULL,R.; HULL,S. Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *E.coli* **Infect. Immun.**, **57**:446-451,1989.
- NOWICKI,B.; MOSELEY,S.; HULL,R.; HULL,S.; MOULDS,J. The Dr hemagglutinin,a fimbrial adhesin AFA-I and AFA-III,and F1845 fimbriae of uropathogenic and

diarrhea-associated *E.coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect. Immun.**, **58**:279-281,1990.

OFEK,I.; MOSEK,A.; SHARON,N. Mannose - specific adherence of *Escherichia coli* freshly excreted in the urine of patients with urinary tract infections and of isolates subcultured from the infected urine. **Infect. Immun.**, **34**:708-710,1981.

O'HANLEY, P.; LARK, D.; FALKOW, S.; SCHOOLNIK, G.. Molecular basis of *Escherichia coli* colonization of the upper urinary tract in BALB/c mice: GAL-GAL pili immunization prevents *Escherichia coli* pyelonephritis in the BALBc mouse model of human pyelonephritis. **J. Clin. Invest.**, **75**: 347-360,1985.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; BIRCH-ANDERSON, A.. Comparison of *Escherichia coli* fimbrial antigen F7 with type 1 fimbriae. **Infect. Immun.**, **27**: 657-666,1980.

ORSKOV,I.; ORSKOV,F.; BIRCH-ANDERSEN,A.; KANAMORI,M.; SVANBORG-EDÉN,C. O,K,H and fimbrial antigens in *E.coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. **Scand. J. Infect. Dis., suppl. 33**:18-25,1982.

ORSKOV,F & ORSKOV,I. From the National Institute of Health. Summary of a workshop on clone concept in the epidemiology taxonomy and evolution of the enterobacteriaceae and other bacteria. **J.Infect.Dis.**, **148**:346-357,1983a.

ORSKOV,I. & ORSKOV,F. Serology of *E.coli* fimbriae. **Prog. Allergy 33**:80-105,1983b.

ORSKOV,I. & ORSKOV,F. *E.coli* in extra-intestinal infections. **J. Hyg.**, **95**:551-575,1985.

ORSKOV,I.; WILLIAMS,P.H.; SVANBORG-EDÉN,C.; ORSKOV,F. Assessment of biological and colony hybridization assays for detection of the aerobactin system in *E.coli* from urinary tract infections. **Med. Microbiol. Immunol.**, **178**:143-148,1989

- PARKKINEN, J.; VIRKOLA, R.; KORHONEN, T.K.. Identification of factors in human urine that inhibit the binding of *Escherichia coli* adhesins. **Infect. Immun.**, **56**:2623-2630,1988.
- PARSON, C.L.; GREENSPAN, C.; MULHOLLAND, S.G.. The primary antibacterial defense mechanism of the bladder. **Invest. Urol.**, **13**: 72-78,1975.
- PARSONS, C.L.; GREENSPAN, C.; MOORE, S.. Role of surface mucin in primary antibacterial defense of bladder. **Urology** **9**:48-52,1977.
- PARSONS, C.L.; MULHOLLAND, S.G.; ANWAR, H.. Antibacterial activity of bladder surface mucin duplicated by exogenous glycosaminoglycan (heparin). **Infect. Immun.**, **24**: 552-557,1979.
- PARSONS, C.L.; SCHMIDT J.D.. In vitro bacterial adherence to vaginal cells of normal and cystitis prone women . **J.Urol.**, **123**: 184-187,1980.
- PERE, A.; LEINONEN, M.; VÄISÄNEN-RHEN, V.; RHEN, M.; KÖRHONEN, T.K. Occurrence of type-1C fimbriae on *E.coli* isolated from human extraintestinal infections. **J. Gen. Microbiol.**, **131**:1705-1711,1985.
- PERE, A.; NOWICKI, B.; SAXÉN, H.; SIITONEN, A.; KORHONEN, T.K.. Expression of P, type-1 and type-1C fimbriae of *Escherichia coli* in the urine of patients with acute tract infection. **J. Infect. Dis.**, **156**: 567-574,1987.
- PFAU, A. & SACHS, T. The bacterial flora of the vaginal vestibule, urethra and vagina in premenopausal women with recurrent tract infections. **J.Urol.**, **120**:630- .1981.
- ROBERTS, J.; HARDAWAY, K.; KAACK, B.; FUSSEL, E.N.; BASKIN, G.. Prevention of pyelonephritis by immunization with P-fimbriae. **J. Urol.**, **131**: 602-607,1984a.

ROBERTS,J.A.; KAACK,B.; KÄLLENIOUS,G.; MÖLLBY,R.; WINBERG,J.; SVENSON, S.B.. Receptors for pyelonephritogenic *Escherichia coli* in primates. **J.Urol.**, **131**: 163-168,1984b.

ROBERTS,J.A.;SUÂRES,G.M.; KAACK,B.;KÄLLENIOUS,G.; SVENSON,S.B.. Experimental pyelonephritis in the monkey. Vii. Ascending pyelonephritis in the absense of vesicouretral reflux. **J.Urol.**, **133**:1068-1075,1985.

SANDBERG,T.;KAUSER,B.;LINDIN-JANSON,G.; LINCOLN, K.; ORSKOV,F.; ORSKOV,I.;STOKLAND,E.;SVANBORG-EDEN,C. Virulence of *E.coli* in relation to host factors in women with symptomatic urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, 1471-1476,1988

SCHAEFFER A.J.;CHMIEL J.S.;DUNCAN,J.L.; FALKOWSKI, W.S..Mannose-sensitive adherence of *Escherichia coli* to epithelial cells from women with recurrent urinary tract infections.**J.Urol.**, **131**:906-910,1984.

SCHIFFERLI, D.M.; ABRAHAM, S.N.; BEACHER, E.H.. Influence of trimethoprin and sulfamethoxazole on the expression and function of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **154**:490-496,1986.

SHEINFELD,J. SCHAEFFER,A.J.; CORDON-CARDO,C.; ROGATKO AA; FAIR,W.R.. Association of Lewis blood group phenotype with recurrent urinary tract infections in women.**N. Engl. J.Med.**, **320**:773, 1989.

SILVERBLATT,F.S. Host parasite interaction in the rat renal pelvis: a possible role of pili in the pathogenesis of pielonephritis. **J. Exp. Med.**, **140**: 1696-1698,1974.

SMITH,H.W.. The haemolysins of *Escherichia coli*.**J.Pathol.Bacteriol.**, **83**:197-211,1963.

SOBEL,J.D. Bacterial etiologic agents in the pathogenesis of urinary tract infection.

Med.Clin. North. Am. 75:253-273,1991

STAMEY,T.A.;FAIR,W.R.;TIMOTHY,M.M.:Antibacterial nature of prostatic fluid.**Nature** 218:444-448,1968.

STAMEY,T.A.,Timothy,M.M.,Millan,M..Recurrent urinary infections in adult women:The role of introital enterobacteria. **Calif. Med.**, 155:1,1971.

STAMEY,T.A..The role of introital enterobacteria in current urinary infections.**J. Urol.**, 109:467,1973

STAMEY,T.A. The Diagnosis,Localization,and Classification of Urinary Infections.
Stamey,T.A.. Pathogenesis and Treatment of Urinary Tract Infections. USA Ed.
Willians & Wilkins,1-51,1980.

SVANBORG ÉDEN,C.; HANSON, L.A.; JODAL,U.; AKERLUNG,A.S.. Variable adherence to normal human urinary-tract epithelial cells of *E.coli* strains associated with various forms of urinary tract infection. **LancetII**:490-492,1976.

SVANBORG - ÉDEN.C.; ERIKSSON B.; HANSON,L.A.;JODAL U.;KAJER,B.;LIDIN-JANSON,G.;LINDBERG,U.;OLLING,S. Adhesion to normal human uroepithelial cells of *E.coli* from children with various forms of urinary tract infection. **J.Pediatr.**, 93:398-403,1978.

SVANBORG ÉDEN,C .& HANSON H.A. *E.coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary epithelial cells.**Infect. Immun.**, 21:229-237,1978.

SVANBORG ÉDEN,C..Attachment of *E.coli* to human urinary tract epithelial cells. **Scand. J. Infect. Dis.**, ; Suppl.15,1978.

- SVANBORG-ÉDEN,C.; HAGBERG,L.; HANSON,L.A.; HULL,S.; JODAL, U.;
LEFFLER H.; LOMBERG, H. ; STRAUBE, E. .Bacterial adherence,a pathogenic
mechanism in urinary tract infection caused by *E.coli*. **Prog. Allergy**, **33**:175-
188,1983a.
- SVANBORG-ÉDEN, G.; GOTSCHLICH, E.C.; KORHONEN, T.K.. Aspects of structure
function of pili of uropathogenic *E.coli*. **Prog. Allergy**, **33**: 189,1983b.
- SVANBORG-ÉDEN, G; BJURSTEN,L.M.; HULL,S; HULL,R; MAGNUSSON,K.E.;
MOLDOVANO,Z.; LEFFLER,H.. Influence of adhesinas on the interaction of
Escherichia coli with human phagocytes. **Infect. Immun.**, **44**: 672-680,1984
- SVANBORG-ÉDEN, G.; HAGBERG, L.; HULL, S; MAGNUSSON,K.,E.. Bacterial
virulence versus host resistance in urinary tracts of mice. **Infect. Immun.**, **55**: 1224-
1232,1987.
- SVANBORG-ÉDEN,C. & de MAN,P...Bacterial virulence in urinary tract infection.**Infect.**
Dis. Clin. North. Am., **1**:731-750,1987.
- SVENSON S.B.; KÄLLENIUS,G.; MÖLLBY,R.; HULTBERG, H ; WINBERG, J..Rapid
identification of P-fimbriated *E.coli* by a receptor-specific particle agglutination
test.**Infection**, **10**:209-214,1982.
- SVENSON,S.B.; HULTBERG,H.;KÄLLENIUS G.; KORHONEN, T.K.;MÖLLBY,R.;
WINBERG,J. .P-fimbriae of pyelonephritogenic *E.coli*: identification and chemical
characterization of receptors. **Infection**, **11**:61-67,1983.
- SVENSON S.B. & KÄLLENIUS,G.. Density and localization of P-fimbriae specific
receptors on mammalian cells:fluorescence-activated cell analysis.**Infection**, **11**:6-
12,1983.

- TAYLOR, P.W. Sensitivity of some smooth strains of *Escherichia coli* to the bacterial action of normal human serum. **J.Clin.Pathol.**, **27**: 626-629, 1974.
- TAYLOR, P.W.. Immunochemical investigation of lipopolysaccharides and acidic polysaccharides from serum-sensitive and serum-resistant strains of *Escherichia coli* from urinary tract infections. **J.Med.Microbiol.**, **9**: 405-421, 1976.
- TAYLOR, P.W. & ROBBINSON, M.K.. Determinants that increase the serum resistance of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **29**: 278-280, 1980.
- THULESIUS, O. & ARAJ, G.. The effect of uropathogenic bacteria on ureteral motility. **Urol. Res.**, **15**: 273-276, 1987.
- TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R.. EPM: modificação do meio de Rugai e Araujo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofanodesaminase. **Rev.Microbiol.**, **13**: 309-315, 1982a
- TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R.. MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. **Rev.Microbiol.**, **13**: 230-235, 1982b
- VÄISÄNEN-RHEN, V.. Fimbriae-like hemagglutinin of *Escherichia coli* O75 strains. **Infect. Immun.**, **46**: 401-407, 1984.
- van den BOSCH, J.F.; POSTMA, P.; KOOPMAN, P.A.R.; de GRAAF, F.; MacLAREN, D.M.. Virulence of urinary and faecal *Escherichia coli* in relation to serotype, haemolysis and haemagglutination. **J.Hyg.**, **88**: 567-577, 1982.
- VIRKOLA, R.; KUUSELA, P.; VARTIO, T.; VAN DIE, I.; KORHONEN, T.K.. A novel lectin-independent interaction of P fimbriae of *Escherichia coli* with immobilized fibronectin. **FEBS Lett**, **243**: 199-204, 1987.

- WATANABE,D.S.A.; LOPES,C.A.M.; DECARLIS, R.M.S.T.; MICHELIN,L.A.;
MONTELLI,A.C.. Sorogrupos de *Escherichia coli* envolvidos em infecção urinária,
em Botucatu SP. **Rev.Microbiol.**, 16:240-244,1985
- WESTERLUND,B.; KUUSELA P.;RISTELE,J.;RISTELL,L.; VARTIO,T.;RAUVALA,H.;
VIRKOLA,R.;KORHONEN,T.K.. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia*
coli uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. **Mol.**
Microbiol., 3:329-337,1989.

ANEXOS



		H	H	U	N				S		I		
O	N	E	E	R	L	N			E		T	H	
B	U	H	C	I	U	E	O	F	X	I	U	E	H
S	M	U	O	I	C	M	X	P	O	D	R	M	L
1	1	+	-	BLH	370000	20000	-	+	F	23.0	-	-	-
2	2	-	-	BL	10000	2000	CNF1	-	M	39.0	-	+	+
3	4	-	-	BLH	640000	20000	-	-	F	23.0	-	-	-
4	5	-	+	BL	300000	2000	CNF1	-	F	65.0	-	+	+
5	6	+	+	BL	12000	6000	CNF1	-	F	36.0	+	-	+
6	7	-	-	BL	1E6	2000	-	-	M	67.0	-	-	-
7	8	-	-	BL	12000	1000	-	-	F	46.0	+	-	-
8	9	-	-	BL	1E6	2000	-	-	F	43.0	-	-	-
9	11	-	+	BSL	2000	1000	CNF1	-	F	24.0	-	+	+
10	12	-	-	BSL	3000	1000	-	-	F	73.0	-	-	-
11	13	-	+	BL	42000	3000	-	+	F	27.0	-	-	-
12	14	-	-	BL	10000	1000	-	-	F	52.0	-	-	-
13	15	+	-	BLH	22000	16000	-	+	M	52.0	-	-	-
14	16	-	-	BLH	1E6	150000	-	+	F	48.0	-	-	+
15	17	-	-	BLH	80000	400000	CNF1	-	F	47.0	-	+	+
16	18	-	-	BLH	50000	7000	-	-	F	59.0	-	-	-
17	19	+	+	BL	9000	1000	-	+	F	35.0	-	+	+
18	20	-	-	BLH	400000	22000	-	-	F	32.0	+	-	-
19	22	-	+	BL	8000	1000	CNF1	-	F	35.0	+	+	+
20	23	-	+	BL	34000	2000	CNF1	-	F	49.0	-	+	+
21	24	-	+	BSL	3000	1000	CNF1	-	F	49.0	-	+	-
22	25	-	-	BSL	2000	8000	CNF1	-	F	36.0	-	+	+
23	26	+	+	BSL	3000	1000	-	-	F	36.0	-	-	-
24	27	-	+	BSL	2000	1000	-	-	F	22.0	-	-	-
25	28	+	+	BL	22000	2000	-	+	F	41.0	-	+	+
26	29	-	-	BL	1E6	2000	-	-	F	34.0	-	-	-
27	30	-	-	BSL	4000	3000	-	-	F	46.0	-	-	-
28	31	-	-	BL	1E6	2000	-	-	F	21.0	-	-	-
29	32	+	-	BL	7000	1000	-	+	F	45.0	-	+	+
30	33	+	-	BLH	1E6	38000	-	+	F	56.0	-	-	-
31	34	-	+	BSL	2000	1000	CNF1	-	F	20.0	-	+	+
32	35	+	-	BLH	420000	510000	-	+	F	20.0	-	+	+
33	36	-	+	BL	42000	1000	CNF1	-	F	3.0	-	+	+
34	37	+	+	BLH	1E6	20000	CNF1	-	F	29.0	-	+	+
35	38	-	-	BSL	2000	1000	-	-	F	68.0	-	-	-
36	39	+	-	BLH	80000	30000	CNF1	+	F	35.0	-	+	+
37	40	-	-	BL	1E6	2000	-	-	M	42.0	-	+	+
38	41	-	-	BL	13000	2000	-	-	F	18.0	-	-	-
39	42	-	-	BL	55000	2000	-	-	F	23.0	-	-	-
40	43	+	-	BLH	15000	8000	-	-	F	44.0	+	-	-
41	44	-	-	BLH	1E6	28000	-	-	F	5.0	-	-	-

		H	H	U	N				S		I		
O	N	E	E	R	L	N	T		E		T	H	
B	U	H	C	I	U	E	O	F	X	I	U	E	H
S	M	U	O	I	C	M	X	P	O	D	R	M	L
42	45	-	-	BL	1E6	2000	-	-	F	82.0	-	-	-
43	46	+	-	BL	1E6	2000	-	+	F	49.0	-	+	+
44	47	+	-	BLH	200000	10000	-	+	F	36.0	-	+	+
45	49	-	-	BLH	22000	10000	CNF1	-	F	36.0	+	-	+
46	50	-	-	BSL	4000	6000	CNF1	-	F	72.0	-	-	+
47	51	-	-	BLH	300000	10000	-	-	F	77.0	+	-	-
48	52	+	-	BLH	400000	400000	-	+	F	35.0	-	-	-
49	53	-	-	BLH	800000	35000	-	-	F	43.0	-	-	-
50	54	+	-	BL	48000	2000	-	-	F	7.0	-	-	-
51	55	-	-	BLH	250000	6000	-	-	F	37.0	+	-	-
52	56	-	-	BL	50000	5000	-	-	F	37.0	-	-	-
53	57	-	+	BLH	250000	15000	CNF1	-	F	69.0	-	+	+
54	58	-	-	BSL	3000	6000	CNF1	-	F	38.0	-	-	-
55	59	+	-	BL	92000	1000	-	+	F	5.0	-	-	-
56	60	+	-	BL	65000	2000	-	-	F	2.0	-	-	-
57	61	+	+	BLH	1E6	1E6	CNF1	-	F	40.0	-	+	+
58	62	+	-	BLH	1E6	20000	-	-	F	38.0	-	+	-
59	63	+	-	BSL	2000	1000	-	+	F	52.0	-	+	-
60	64	+	+	BLH	140000	12000	CNF1	+	F	25.0	-	+	+
61	66	-	-	BL	200000	2000	-	-	M	82.0	-	+	-
62	67	-	+	BL	150000	3000	-	-	F	3.0	-	-	+
63	68	-	-	BLH	120000	50000	-	-	F	49.0	-	-	-
64	69	+	+	BLH	240000	9000	CNF1	-	F	30.0	-	-	+
65	72	-	-	BLH	1E6	30000	-	-	F	69.0	-	-	-
66	74	+	-	BLH	300000	15000	CNF1	+	F	29.0	-	-	+
67	75	-	-	BLH	320000	320000	-	-	F	20.0	-	-	-
68	76	-	+	BL	160000	3000	CNF1	-	F	75.0	-	+	+
69	78	-	-	BLH	1E6	16000	-	-	F	48.0	+	-	-
70	79	+	-	BL	1E6	3000	-	-	F	52.0	-	+	+
71	80	+	-	BL	31000	6000	-	+	F	60.0	-	-	-
72	81	+	-	BLH	1E6	22000	-	+	F	1.0	-	-	-
73	82	-	-	BL	65000	2000	CNF1	-	F	36.0	+	+	+
74	118	-	+	BLH	42000	11000	-	-	F	20.0	-	-	-
75	121	+	+	BLH	1E6	1E6	CNF1	+	M	72.0	-	+	+
76	122	-	+	BL	24000	1000	-	-	F	22.0	-	-	-
77	123	+	+	BSL	1000	10000	-	-	F	25.0	-	-	-
78	129	+	+	BL	16000	1000	-	-	F	25.0	-	+	-
79	133	-	-	BL	1E6	3000	-	-	F	25.0	-	-	-
80	134	+	+	BLH	10000	25000	-	-	F	72.0	-	-	-
81	136	-	+	BSL	4000	1000	CNF1	-	F	38.0	-	+	+
82	138	-	+	BLH	1E6	30000	-	-	F	54.0	-	-	-

O	N	H	H	U	N	N	S	I					
B	U	E	E	R	L	H	T		E		I	T	H
S	M	U	O	I	C	E	O	F	X	D	R	M	L
83	140	-	-	BLH	1E6	160000	-	+	F	21.0	-	+	-
84	141	-	-	BSL	4000	1000	-	-	F	36.0	-	-	-
85	144	+	+	BLH	460000	50000	-	-	F	30.0	-	-	-
86	145	-	-	BLH	29000	9000	CNF1	-	F	61.0	-	-	-
87	146	+	-	BL	300000	5000	-	+	F	33.0	-	-	-
88	147	-	-	BL	55000	3000	-	-	F	2.0	+	-	-
89	148	+	+	BL	95000	3000	CNF1	-	F	32.0	-	+	+
90	149	+	-	BL	15000	1000	-	+	F	5.0	-	-	-
91	150	+	+	BLH	12000	8000	CNF1	-	F	54.0	+	+	+
92	151	-	+	BSL	4000	1000	-	-	F	9.0	-	-	-
93	152	-	-	BL	6000	1000	-	-	F	78.0	-	+	+
94	153	-	+	BL	118000	4000	-	-	F	30.0	-	-	-
95	154	-	+	BSL	1000	1000	CNF1	-	F	54.0	-	+	+
96	156	+	+	BLH	1E6	1E6	-	+	F	0.2	+	-	-
97	157	-	-	BL	7000	1000	-	-	F	72.0	-	-	-
98	158	-	-	BL	16000	2000	-	-	F	43.0	-	-	-
99	159	-	+	BSL	4000	1000	-	-	F	76.0	-	-	+
100	160	-	-	BL	10000	1000	-	-	F	60.0	+	-	-
101	161	-	+	BL	65000	1000	-	-	F	68.0	-	-	-
102	162	-	+	BL	12000	1000	-	-	F	31.0	-	-	-
103	163	-	+	BL	9000	1000	-	-	F	35.0	-	-	-
104	164	-	-	BLH	12000	8000	-	-	F	0.1	-	-	-
105	165	+	+	BLH	440000	75000	-	+	F	77.0	-	-	-
106	166	-	+	BSL	2000	6000	-	-	F	50.0	-	-	-
107	168	-	+	BL	1E6	2000	CNF1	-	F	24.0	-	+	+
108	169	+	+	BLH	200000	180000	-	+	F	72.0	-	+	+
109	170	+	+	BLH	1E6	30000	-	+	F	0.3	-	-	-
110	171	+	-	BLH	1E6	1E6	-	-	F	38.0	-	-	-
111	172	-	+	BLH	1E6	60000	CNF1	-	F	46.0	-	-	+
112	173	-	+	BLH	12000	7000	-	-	F	36.0	-	-	-
113	174	+	+	BLH	1E6	60000	-	-	F	17.0	-	-	-
114	175	+	-	BLH	1E6	8000	-	+	F	1.0	-	-	-
115	176	-	+	BL	15000	1000	-	-	F	50.0	-	-	-
116	177	-	-	BSL	3000	1000	-	-	F	35.0	-	-	-
117	178	+	-	BL	8000	1000	-	+	F	6.0	-	-	-
118	179	+	+	BLH	1E6	21000	-	+	F	0.8	-	+	+
119	180	-	-	BLH	1E6	40000	CNF1	-	F	58.0	-	-	-
120	181	-	+	BL	140000	2000	CNF1	-	F	25.0	-	-	+
121	182	+	+	BL	110000	2000	-	+	F	31.0	-	-	-
122	183	-	+	BLH	1E6	8000	CNF1	-	F	50.0	-	+	+
123	184	+	+	BL	280000	2000	-	+	M	35.0	-	+	+

O	N	H	H	U	N	N	S	I					
B	U	E	E	R	L	H	E	T	F	X	I	U	H
S	M	U	O	I	C	M	X	P	O	D	R	M	L
124	185	-	-	BL	60000	2000	CNF1	+	F	36.0	-	+	+
125	186	-	+	BLH	560000	120000	CNF1	-	F	46.0	-	+	+
126	187	-	-	BL	6000	1000	-	-	F	32.0	-	-	-
127	191	-	+	BL	63000	2000	CNF1	-	F	36.0	-	+	+
128	192	-	+	BL	1E6	3000	-	-	F	2.0	+	-	-
129	193	-	+	BL	400000	3000	CNF1	-	F	34.0	-	+	+
130	194	+	-	BLH	15000	20000	CNF1	-	F	46.0	-	-	+
131	195	-	+	BLH	6000	20000	-	-	F	32.0	+	-	-
132	196	-	-	BLH	180000	8000	-	-	F	0.4	-	-	-
133	197	+	+	BLH	1E6	12000	-	+	M	0.7	-	-	-
134	198	-	+	BLH	1E6	62000	-	-	F	30.0	-	-	-
135	199	+	+	BLH	20000	75000	-	+	F	36.0	-	-	+
136	200	-	+	BLH	60000	30000	-	-	F	34.0	-	-	-
137	201	+	+	BLH	1E6	18000	-	+	F	2.0	-	-	-
138	202	+	+	BSL	2000	2000	-	-	F	38.0	-	-	-
139	203	-	+	BSL	2000	2000	-	-	F	59.0	-	-	-
140	204	-	+	BSL	2000	1000	-	-	F	76.0	-	-	-
141	205	-	-	BSL	2000	1000	-	+	F	29.0	-	-	-
142	206	+	+	BSL	5000	1000	-	-	F	45.0	-	-	-
143	207	-	-	BSL	4000	1000	CNF1	-	F	63.0	-	+	+
144	208	-	-	BL	6000	1000	-	-	F	34.0	-	-	-
145	210	+	-	BL	6000	1000	-	+	F	5.0	-	-	-
146	211	+	-	BSL	2000	1000	-	+	F	42.0	-	-	-
147	212	-	+	BL	8000	1000	-	-	F	50.0	-	-	-
148	213	-	+	BSL	2000	1000	CNF1	-	F	32.0	-	-	-
149	214	-	+	BSL	1000	1000	CNF1	-	F	62.0	-	+	+
150	215	-	+	BSL	4000	2000	-	-	F	34.0	-	-	-
151	216	+	-	BSL	4000	1000	-	+	F	62.0	-	+	+
152	217	-	-	BSL	2000	1000	-	-	F	47.0	-	-	-
153	218	-	-	BL	165000	2000	-	-	F	23.0	-	-	-
154	219	-	-	BL	17000	2000	-	-	F	31.0	-	-	-
155	220	-	-	BSL	2000	1000	-	-	F	42.0	-	-	-
156	221	+	-	BSL	3000	2000	-	-	F	8.0	-	-	-
157	222	-	+	BSL	3000	1000	-	-	F	31.0	-	-	-
158	223	-	+	BL	6000	1000	CNF1	-	F	24.0	-	+	+
159	224	-	+	BLH	6000	7000	-	-	F	33.0	-	-	-
160	225	-	+	BL	1E6	5000	-	-	F	34.0	-	-	-
161	226	-	-	BL	1E6	3000	-	-	F	46.0	-	+	+
162	227	+	+	BL	19000	2000	-	-	F	8.0	-	-	-
163	228	-	+	BL	73000	2000	-	-	F	19.0	-	-	-
164	229	-	+	BSL	3000	1000	-	-	F	68.0	-	-	-

O	N	H	H	U	N	N	S	I					
B	U	E	E	R	L	H	T	E					
S	M	U	C	I	E	E	O	X	F	P	O	D	R
			O	I	C	M	X						M
													L
165	230	-	+	BL	25000	2000	-	-	F	22.0	-	-	-
166	231	-	+	BL	7000	1000	CNF1	-	F	25.0	-	+	+
167	232	+	-	BSL	4000	2000	-	-	F	34.0	-	-	-
168	233	-	+	BSL	4000	1000	CNF1	-	F	30.0	-	+	+
169	234	-	+	BL	70000	3000	CNF1	-	F	27.0	-	+	+
170	235	-	-	BL	50000	1000	-	-	F	50.0	-	-	-
171	236	-	-	BSL	1000	15000	-	-	F	33.0	-	-	-
172	237	-	-	BL	7000	2000	-	-	F	62.0	-	-	-
173	238	+	+	BL	1E6	3000	-	+	F	54.0	-	+	+
174	239	-	+	BLH	1E6	7000	-	-	F	38.0	-	-	-
175	240	+	+	BSL	4000	1000	CNF1	-	F	29.0	-	+	+
176	241	+	+	BL	45000	1000	CNF1	+	M	8.0	+	+	+
177	242	-	-	BLH	8000	100000	-	-	F	29.0	-	-	-
178	243	-	-	BL	50000	1000	CNF1	-	M	72.0	-	+	+
179	244	-	+	BL	53000	4000	CNF1	-	F	45.0	-	+	+
180	245	-	-	BL	150000	2000	-	-	F	17.0	-	-	-
181	246	-	-	BL	100000	1000	-	-	F	57.0	-	-	-
182	247	+	-	BL	145000	3000	-	+	M	40.0	-	+	+
183	248	-	+	BL	600000	2000	-	-	F	28.0	-	-	-
184	249	-	-	BSL	2000	1000	-	-	F	72.0	-	-	-
185	250	-	+	BL	120000	2000	CNF1	-	M	39.0	-	+	+
186	251	-	-	BL	28000	3000	-	-	F	4.0	-	-	-
187	252	-	-	BL	6000	3000	-	-	F	67.0	-	-	-

TABELA DE χ^2 QUADRADO ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA

fatores de virulência	faixas etárias das pacientes (anos)			
	< 30	<=49	>=50	>60
Hly X tipo 1	$\chi^2=10,143$ GL= 1 p=0,001	$\chi^2=8,232$ GL=1 p=0,004	$\chi^2=1,774$ GL=1 p=0,182	$\chi^2=1,51$ GL= 1 p=0,219
Hly X CNF1	$\chi^2=38,643$ GL=1 p=0,001	$\chi^2=59,203$ GL=1 p=0,001	$\chi^2=10,744$ GL=1 p=0,001	$\chi^2=10,244$ GL=1 p=0,001
Hly X FP	$\chi^2=9,139$ GL=1 p=0,923	$\chi^2=2,325$ GL=1 p=0,127	$\chi^2=1,537$ GL=1 p=0,215	$\chi^2=1,708$ GL=1 p=0,191
tipol X CNF1	$\chi^2=11,030$ GL=1 p=0,0008	$\chi^2=12,644$ GL=1 p=0,0003	$\chi^2=0,992$ GL=1 p=0,319	$\chi^2=1,081$ GL=1 p=0,298
tipol X FP	$\chi^2=4,674$ GL=1 p=0,031	$\chi^2=5,531$ GL=1 p=0,0018	$\chi^2=0,041$ GL=1 p=0,839	$\chi^2=2,162$ GL=1 p=0,141
CNF1 X FP	$\chi^2=1,529$ GL=1 p=0,216	$\chi^2=3,090$ GL=1 p=0,078	$\chi^2=2,722$ GL=1 p=0,098	$\chi^2=0,079$ GL=1 p=0,779