

## **AVALIAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA E FORMAÇÃO DOS BIOFILMES EM *Escherichia coli* ISOLADAS EM UM LABORATÓRIO CLÍNICO DE PRESIDENTE PRUDENTE/SP**

Hevelin Regiane Augusto Da Silva<sup>1</sup>, Mikaely Aparecida De Souza Bonifácio<sup>2</sup>, Mayla Silva Cayres De Oliveira<sup>1</sup>, Lizziane Kretli Winkelstroter Eller<sup>1,2</sup>

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, <sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, <sup>2</sup>Faculdade de Biomedicina, Presidente Prudente, SP. Financiamento: CNPq-PIBIC 118914/2016-2. E-mail: [lizzianekretli@gmail.com](mailto:lizzianekretli@gmail.com)

### **RESUMO**

*Escherichia coli* é um dos principais microrganismos causadores da infecção do trato urinário (ITU). O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de genes de virulência, formação dos biofilmes e a potencial inibição dos biofilmes por óleo essencial de gengibre e anis estrelado em *Escherichia coli* isoladas de um laboratório clínico de Presidente Prudente-SP. Na formação de biofilmes foi utilizada a técnica de microplaca de titulação e para avaliar a presença dos genes de virulência foi utilizada a reação da polimerase em cadeia. Os resultados demonstraram que 100% dos isolados formaram biofilmes. Apenas seis isolados apresentaram redução dos biofilmes em presença de óleo essencial. O gene de virulência mais frequente foi o *fimH* (100%) seguido do *kpsMTII* (99,9%) *papC* (98,9%) e *fliC* (84,8%). Ressaltamos que os microrganismos podem estar em fase de acumulação progressiva de fatores de virulência o que facilita o aumento da gravidade da infecção no hospedeiro.

**Palavras-chave:** adesão, cristal violeta, reação de polimerase em cadeia, concentração bactericida mínima.

### **EVALUATION OF VIRULENCE GENES AND FORMATION OF BIOFILMS IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM A CLINICAL LABORATORY IN PRESIDENTE PRUDENTE/SP**

#### **ABSTRACT**

*Escherichia coli* is one of the main microorganisms that cause urinary tract infection (UTI). The objective of this work was to evaluate the presence of virulence genes, the biofilm formation and the potential inhibition of biofilms by essential oil of ginger and star anise in *Escherichia coli* isolated from a clinical laboratory at Presidente Prudente-SP. In the biofilm formation, the titration microplate technique was used and the polymerase chain reaction was used to evaluate the presence of the virulence genes. The results showed that 100% of the isolates formed biofilms. Only six isolates presented reduction of biofilms in presence of essential oil. The most frequent virulence gene was *fimH* (100%) followed by *kpsMTII* (99.9%) *papC* (98.9%) and *fliC* (84.8%). We emphasize that the microorganisms may be in a phase of progressive accumulation of virulence factors which facilitates the increase of the severity of the host infection.

**Key words:** urinary tract infection, essential oils, adhesion, virulence factors, minimum bactericidal concentration.

#### **INTRODUÇÃO**

Infecção do trato urinário (ITU) é uma das infecções bacterianas mais comuns na atenção primária e se estabelece quando ocorre a colonização e multiplicação de microrganismos patogênicos no trato urinário. A ocorrência da infecção do trato urinário

pode variar de acordo com a idade e o gênero, bem como o contexto socioeconômico. Além disso, esta doença é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, e possui um papel relevante na resistência aos antimicrobianos devido ao tratamento empírico<sup>1,2</sup>.

O diagnóstico da ITU leva em consideração os dados clínicos e laboratoriais. É necessário a anamnese e um exame físico detalhado para se observar a sintomatologia específica e sintomas gerais associados, ao padrão miccional, ao hábito intestinal e as características do jato urinário<sup>3</sup>. Quanto aos exames laboratoriais, normalmente são requeridos: urina de rotina, urocultura, antibiograma, e em alguns casos hemocultura e exames de imagem<sup>4,5</sup>.

A ITU comunitária tem como principais agentes etiológicos *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, espécies de *Proteus* e de *Klebsiella*. Apenas *E. coli* responde por 70% a 85% dos casos de ITU comunitária<sup>6</sup>. Os agentes etiológicos de ITU adquirida em hospitais são mais diversificados, é observado um predomínio de *Proteus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Enterococcus faecalis* e de fungos, principalmente *Candida sp.*<sup>7,8</sup>.

A bactéria *E. coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo, que integra a microbiota normal do intestino humano e de outras espécies animais. Cepas de *E. coli* associadas a infecções intestinais são chamadas de *E. coli* diarréogênicas (DEC), sendo classificadas por sorogrupos e sorotipos. Esta classificação leva em consideração características clínicas, epidemiológicas e a presença de fatores de virulência. Atualmente, estas bactérias diarréogênicas são classificadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica ou produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC)<sup>9</sup>. A forma de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) possui dois patotipos: *E. coli* meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* uropatogênica (UPEC)<sup>10,11</sup>.

*E. coli* uropatogênica (UPEC) é isolada frequentemente em infecções do trato urinário<sup>12</sup>. A colonização da mucosa do trato genito-urinário é influenciada pelas interações do hospedeiro com os fatores de virulência da bactéria como, por exemplo, fimbrias ou pili e adesinas. Há relatos de que a presença de fimbria do tipo 1 é um dos fatores de virulência mais estudados nas UPECs, e já foi

observado sua presença em cerca de 80% das cepas<sup>11,13,14</sup>. A presença de outros fatores de virulência como pili conjugativo, polissacarídeos extracelulares, flagelo e curli foram observadas em várias linhagens de *E. coli* e parecem estar intimamente ligadas com a formação de biofilme bacteriano e surgimento da ITU<sup>15,16</sup>.

A capacidade de formar biofilmes é uma característica importante nas bactérias, e pode estar ligada à sua resistência a agentes antimicrobianos, capacidade de gerar infecção e também pode sofrer influências de alguns fatores de virulência<sup>17</sup>.

Nas últimas décadas a presença dos biofilmes tem despertado uma grande preocupação na área médica, pois tem sido relacionado a várias Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), principalmente quando há presença de implantes de prótese, tubos, sondas e cateteres<sup>18-21</sup>. Existem várias abordagens para combater biofilmes como a remoção mecânica, remoção química e o uso de antimicrobianos/sanitizantes. No entanto, os biofilmes são altamente resistentes a estas estratégias. Desta maneira, têm sido desenvolvidos novos métodos para se evitar e remover os biofilmes como: tratamentos enzimáticos, peptídeos naturais, bacteriófagos e produtos naturais de plantas<sup>23-25</sup>.

Os óleos essenciais (OE) são substâncias voláteis naturalmente derivadas de plantas. Vários estudos já demonstraram a aplicação de óleos essenciais como agente antimicrobiano e no controle e prevenção de biofilmes<sup>26,27</sup>. A maioria dos OEs exerce seu efeito antimicrobiano devido à ação direta na estrutura da parede celular microbiana. Os OEs apresentam potencial uso como agentes antimicrobianos uma vez que possuem baixa toxicidade em células eucarióticas, possuem rápida degradação no meio ambiente e não geram resistência a antimicrobianos<sup>24</sup>.

Nesse contexto, cabe salientar a importância dos estudos, envolvendo a formação e caracterização dos biofilmes e, ao mesmo tempo, é extremamente desafiador os estudos que envolvem a busca por novas estratégias para controlar esse complexo modo de vida dos microrganismos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de genes de virulência, formação dos biofilmes e potencial de inibição da formação

dos biofilmes por óleo essencial de gengibre e anis estrelado em isolados de *Escherichia coli*.

## METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste projeto, um total de 100 amostras aleatórias de *E. coli* isoladas de amostras de urina foram gentilmente cedidas por um laboratório de análises clínicas de Presidente Prudente no período de fevereiro/2016 a outubro/2016. A autorização para utilização das bactérias e o projeto de pesquisa foi aprovado de acordo com os protocolos 2849 e 2998 da Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da UNOESTE.

A avaliação da formação de biofilmes foi realizada com os isolados cultivados em caldo BHI a 37°C por 24h. As culturas foram ajustadas por meio de espectrofotometria a 600 nm para o valor 0,1. Alíquotas de 20 µL da suspensão de células de cada isolado foram adicionadas a 200 µL de caldo BHI presente nas cavidades das microplacas de 96 poços, em seguida foram incubadas a 37°C por 24h. As placas foram, então, lavadas três vezes com solução salina 0,9% (m/v) para remoção das células não aderidas. As células aderidas foram coradas com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v) por 5 min. O corante foi removido, a microplaca lavada novamente três vezes e, após secagem por 30 minutos em estufa, foi realizada a solubilização do corante com solução de álcool/acetona (80:20). As densidades ópticas da solução foram lidas em comprimento de onda de 595nm. O valor encontrado é representativo para a adesão de células bacterianas<sup>28,29</sup>.

Foi também avaliado o potencial de inibição da formação de biofilmes por óleos essenciais comerciais de *Zingiber officinale* (gengibre) e *Illicium verum Hook. f.* (estrela de anis) em 30 isolados de *E. coli* escolhidos aleatoriamente. Primeiramente, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) com as seguintes concentrações: 1,5%, 2,5%, 5,0%; 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 25%; 50%; 75%; 80%; 90% e 100%. Em cada poço da microplaca foram

adicionados 100 µL de caldo BHI2x concentrado, 100 µL do óleo essencial e 20ul do inóculo ajustado para 0,1 em DO600nm. Em seguida foi incubado a 37°C por 24h. A determinação das CIMs foi realizada por meio da observação visual da menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento. A determinação CBM foi realizada a partir da semeadura em agar BHI de uma alíquota de 10 µl dos poços onde não havia o desenvolvimento de crescimento bacteriano visível<sup>30</sup>. Nos ensaios para formação de biofilmes em presença de óleo essencial foi adotada a mesma concentração obtida pela determinação do CBM. O ensaio para avaliação da formação do biofilme foi quantificado pelo método de coloração com Cristal Violeta conforme previamente. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Para avaliar a presença e ausência de genes de virulência relacionados com a formação dos biofilmes as amostras foram cultivadas em caldo de BHI a 37°C por 24h. Após este procedimento, o DNA das amostras foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio<sup>31</sup>. O DNA foi quantificado e avaliado quanta a sua pureza por espectrofotometria 260/280nm.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para os genes: *papC* (proteína de membrana externa da fímbria P), *fimH* (adesina da fímbria do tipo1), *kpsMTII* (cápsula), *fliC* (flagelo). A seqüência dos iniciadores, temperatura de anelamento e peso molecular dos produtos foram utilizados de acordo com trabalho realizado por Tiba et al.<sup>29</sup> com modificações, conforme demonstrado no Quadro 1.

O volume total da reação de 10 µL foi composto de 2 µL de DNA (100ng/ul), 6 µL da mistura de reação Taq Master Mix Red (Ampliqon) e 1 µL de cada primer (reverse e forward) com concentração final de 0,10 µM. O protocolo de amplificação consistiu de uma etapa inicial de 94°C por 30 seg, seguida de 30 ciclos de repetições com desnaturação de 94°C por 30 seg, anelamento (diferente para cada primer) por 30 seg e extensão a 72°C por 2 min.

**Quadro 1.** Primers utilizados neste estudo.

Gene	Sequência (5'-3')	Produto amplificado (pb)	Temp. anelamento (T°C)
<i>papC 1</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC	328	62
<i>papC 2</i>	ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A		
<i>fimH1</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG	508	58
<i>fimH2</i>	GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA		
<i>kpsMTII 1</i>	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG	272	62
<i>kpsMTII 2</i>	CAT CAG ACG ATA AGC ATG AGC A		
<i>fliC 1</i>	ATG GCA CAA GTC ATT AAT ACC CAA C	Variável	56
<i>fliC 2</i>	CTA ACC CTG CAG CAG AGA CA		

A presença e ausência dos fatores de virulência foi avaliada por meio da visualização dos produtos da PCR. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, em seguida foram identificadas mediante incubação em solução de brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz UV. Para registro, os géis serão fotografados em fotodocumentador.

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Os níveis de formação de biofilmes foram comparados com a cepa padrão *E. coli* ATCC® 25922 através do teste *t* de Student não pareado considerando o nível de significância de 0,05. A avaliação do efeito do óleo essencial na formação do biofilme foi comparada pelo teste *t* de Student pareado considerando o nível de significância de 0,05.

## RESULTADOS

No presente trabalho foi avaliada a formação de biofilme por 100 estirpes *E. coli* isoladas de urina coletada em um laboratório clínico de Presidente Prudente - SP. Foi utilizada a técnica de adesão em placa de microtitulação e coloração com cristal violeta. Neste contexto, o valor da densidade óptica encontrada a 600nm é um valor representativo para a quantidade de biomassa aderida. Todos os isolados analisados apresentaram capacidade de formar biofilme, entretanto, não foi observado um padrão único de adesão entre as estirpes, uma vez que os valores de densidade óptica a 595nm variaram de 0,03 a 0,88.

Os resultados de DO foram estratificados em quatro grupos conforme a Tabela 1. Foi observado que a maioria dos

isolados (55%) se enquadraram no grupo que representava o menor nível de adesão.

**Tabela 1.** Distribuição dos isolados de acordo com o nível de formação de biofilmes.

Grupo	Valores de DO (600nm)	Número de isolados
1	0,000 ± 0,250	55
2	0,250 ± 0,500	43
3	0,500 ± 0,750	1
4	0,750 ± 1,000	2

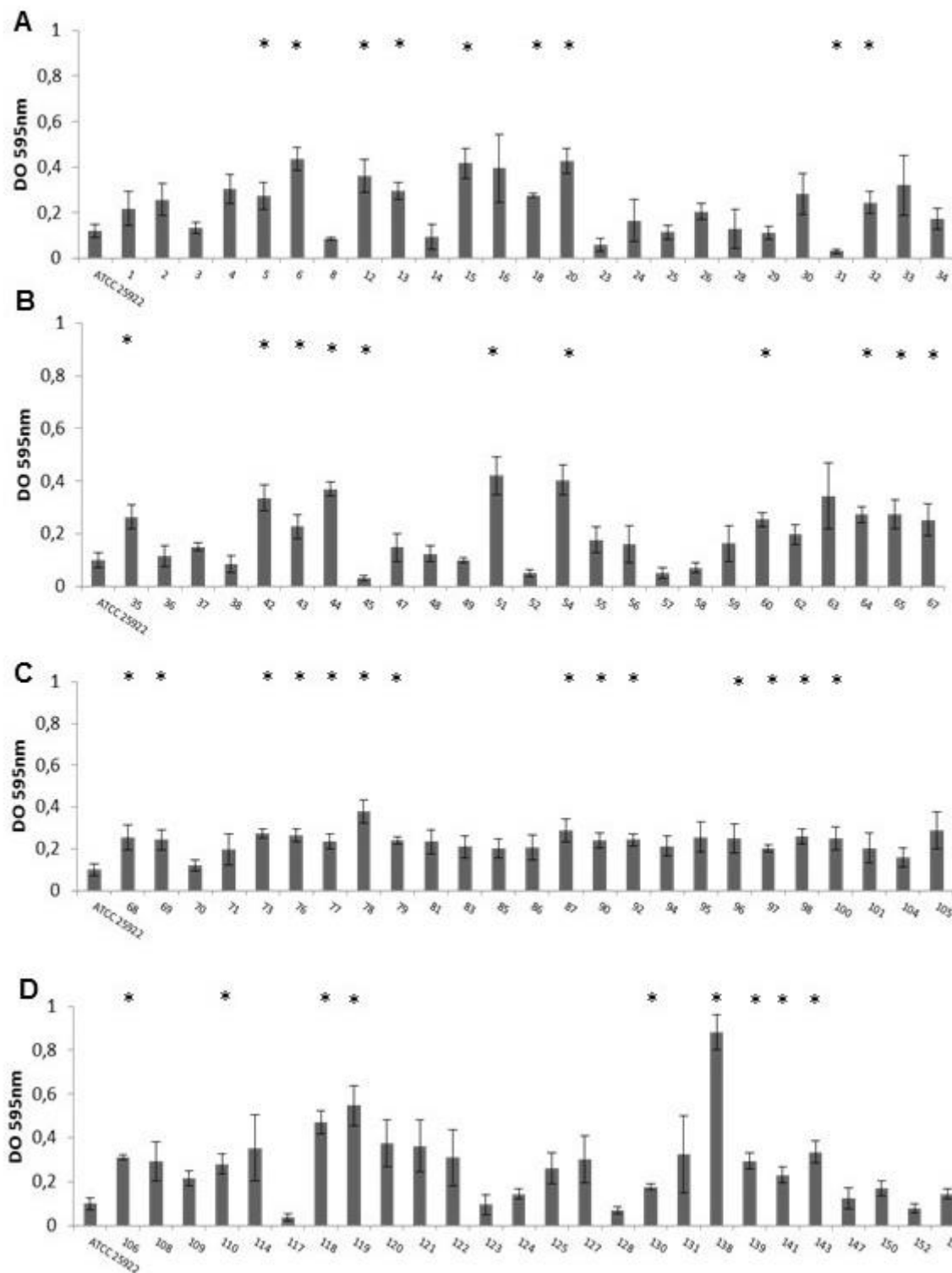
Todos os valores de DO encontrados para os isolados foram comparados com a cepa padrão de *E. coli* ATCC® 25922, uma cepa selvagem de origem clínica (Figura 1. A, B, C, D). O valor da DO para o controle foi  $0,12 \pm 0,02$ . Dentre os resultados encontrados, 42 isolados apresentaram valores estatisticamente maiores e apenas dois demonstraram ter menor capacidade para formar biofilmes se comparado com o *E. coli* ATCC® 25922 ( $p < 0,05$ ).

O efeito antimicrobiano e a capacidade do OE comercial de anis estrelado e de gengibre em inibir a formação dos biofilmes também foi avaliado no presente trabalho. Primeiramente, foi determinado o valor da concentração bactericida mínima dos OE frente às células planctônicas de *E. coli* ATCC® 25922. Não foi observado inibição do OE de anis estrelado para nenhuma das concentrações testadas, entretanto para o OE de gengibre foi obtida uma inibição apenas a 90%.

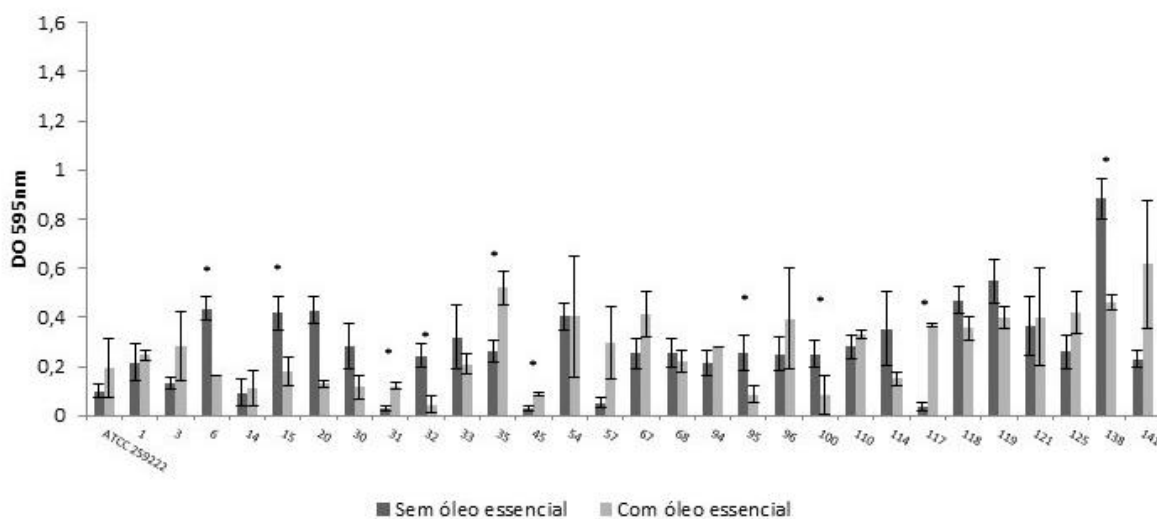
Diante da ausência de efeito antimicrobiano do OE de anis estrelado, os experimentos para avaliar a influência dos OE na formação dos biofilmes foram conduzidos

apenas com o OE de gengibre. De acordo com a figura 2 pode ser observado que não há um padrão no perfil de adesão dos isolados em presença do óleo essencial de gengibre. Dos 30 isolados selecionados apenas 6

apresentaram redução significativa na formação de biofilmes em presença de óleo essencial de gengibre a 90%.



**Figura 1.** Perfil de adesão de isolados de *E. coli* por meio da quantificação espectrofotométrica (595nm) do corante cristal violeta associado as células bacterianas aderidas a placa de poliestireno. Isolados foram comparados com cepa padrão *E. coli* ATCC 25922. \* $p < 0,05$ .



**Figura 2.** Perfil de adesão de isolados de *E. coli* por meio da quantificação espectrofotométrica (600nm) do corante cristal violeta associado as células bacterianas aderidas a placa de poliestireno em presença e ausência de óleo essencial de gengibre a 90%.

Neste trabalho foi avaliada a presença de genes de virulência de *E. coli* como: *fimH* (fímbria do tipo1), *fliC* (flagelina) *papC* (fímbria P) e *kpsMTII* (cápsula) conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores das amostras positivas para os fatores de virulência *fimH* (fímbria do tipo 1), *fliC* (flagelina) *papC* (fímbria P) e *kpsMTII* (cápsula).

Genes	Amostras positivas para os genes de virulência (%)
<i>fimH</i>	101 (100)
<i>fliC</i>	84 (84,8)
<i>papC</i>	98 (98,9)
<i>kpsMTII</i>	99 (99,9)

De acordo com os dados obtidos foi confirmado a prevalência do gene de virulência *fim H* em *E. coli* isolados de urina. Além disso, foi observado um alto índice para a frequência dos outros genes analisados.

## DISCUSSÃO

As infecções do trato urinário são consideradas uma das mais comuns na área médica e devido a sua alta incidência desperta grande preocupação na Saúde Pública. *E. coli*

é o principal agente causador sendo isolado em cerca de 80% dos casos. Vários fatores de virulência são necessários para a adesão inicial e colonização das superfícies do trato-urinário do hospedeiro como as fímbrias, adesinas, flagelo, toxinas, sideróforos, enzimas e polissacarídeos de revestimento<sup>32,33</sup>.

No presente trabalho foi observado uma grande variabilidade no perfil de adesão dos isolados analisados. Os dados corroboram com Blanchette-Cain et al.<sup>34</sup>, que avaliaram a formação de biofilmes por *Streptococcus pneumoniae* e demonstraram que esta é uma característica cepa dependente e pode ser influenciada por vários fatores. Deve-se sempre levar em consideração que diferentes metodologias de quantificação, condições de crescimento, ou temperaturas, podem influenciar os resultados encontrados para o perfil de formação de biofilmes entre vários estudos<sup>35</sup>. Além disso, os microrganismos podem alterar o seu fenótipo para formação de biofilmes em resposta a mudanças nas condições ambientais (temperatura, composição de nutrientes etc) e fases de crescimento<sup>36,37</sup>.

A avaliação da potencial inibição do óleo essencial de anis estrelado e gengibre também demonstrou que o seu efeito pode estar relacionado com características

individuais de cada isolado. Batista et al.<sup>38</sup> avaliaram o efeito antimicrobiano de diferentes óleos essenciais sobre células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, bem como verificaram a ação sanitizante sobre o biofilme formado por esta espécie. De acordo com os autores, todos os óleos essenciais empregados apresentaram, ao menos, efeito bacteriostático contra o microrganismo alvo. No entanto, quando testados em biofilmes, o óleo essencial de gengibre não eliminou as células bacterianas viáveis de *P. aeruginosa*. Lameu<sup>39</sup> demonstrou que solução de óleo essencial de gengibre a 4% apresentou um efeito inibitório em biofilmes de *Salmonella*, entretanto, análise microscópica observou presença de células viáveis após tratamento. Nikolić et al.<sup>40</sup> avaliaram a atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo essencial de gengibre. Segundo os autores a bactéria mais sensível foi *S. aureus* enquanto que *Proteus mirabilis* apresentou maior redução na formação do biofilme. Naquele estudo também foi observado que a *E. coli* ATCC® 25922 não apresentou reduções pronunciadas para a formação de biofilmes em presença do óleo essencial corroborando com alguns resultados do presente estudo.

Acredita-se que a presença de grande quantidade de polissacarídeos na parede celular de bactérias Gram-negativas desfavorece a penetração de substâncias dentro da célula, o que justificaria a baixa sensibilidade dos isolados diante do óleo essencial de gengibre<sup>41</sup>. A estrutura tridimensional dos biofilmes também pode ter influenciado a ação do óleo essencial uma vez que nos biofilmes ocorre: uma difusão limitada de substâncias por meio da matriz extracelular (EPS) do biofilme, interações de agentes antimicrobianos com a matriz, resistência mediada por enzimas, níveis de atividade metabólica dentro do biofilme, adaptação genética e outras estruturas<sup>38</sup>. Além disso, deve-se levar em consideração que cada isolado pode apresentar diferentes fatores de virulência e mecanismos para se protegerem frente a agentes antimicrobianos<sup>42</sup>.

Os isolados de *Escherichia coli* são geneticamente heterogêneo e exibem vários fatores de virulência associados com sua

colonização e sua persistência no trato urinário<sup>43,44</sup>.

No presente estudo foi confirmado a prevalência do gene de virulência *fimH* em *E. coli* isolados de urina. No trabalho realizado por Tabasi et al.<sup>45</sup> demonstrou que o gene *fimH* também foi o mais frequente entre os isolados de UPEC estudados, apresentando 100% de positividade nas amostras. Tiba et al.<sup>43</sup> e Hojati et al.<sup>44</sup> também avaliaram a presença de *fimH* em isolados de *E. coli* relacionados com infecção do trato urinário e encontraram respectivamente 92,8 e 97,5%. Desta maneira fica demonstrada que a subunidade adesiva das fímbrias de tipo 1, FimH, que possui alto tropismo para os receptores do trato urinário demonstrando que a adesão FimH é importante na colonização de diferentes nichos de *E. coli*<sup>44</sup>.

O flagelo (organela responsável pela motilidade) consiste em subunidades repetidas da flagelina protéica que são expressas pelo gene *fliC*<sup>46</sup>. Segundo Tabasi et al.<sup>45</sup> o gene de virulência *fliC* estava presente em 67,5% dos isolados e foi observado em maior frequência em pacientes com cistite se comparado com aqueles com pielonefrite. Tiba et al.<sup>29</sup> observou uma porcentagem de 50% de *fliC* nas amostras de *E. coli* isoladas de ITU. Entretanto, no presente trabalho foram encontrados valores acima daqueles descritos na literatura (84% de amostras positivas).

O gene *papC* da *E. coli* uropatogênica é necessário para a formação do pili. A proteína PapC está localizada na membrana externa de *E. coli*, para formar um canal transmembrana onde subunidades de pilina estão anexadas<sup>47</sup>. No presente trabalho foi encontrado 98,9% das amostras positivas para o gene *papC*. Outros trabalhos obtiveram dados bastantes variados. Tiba et al.<sup>29</sup> e Tiba et al.<sup>43</sup> encontraram respectivamente 44% e 32,4% de presença do gene *papC*. Yun et al.<sup>50</sup> encontraram valor bem abaixo se comparado (3,1%) entretanto este fato pode ser justificado pelo reduzido número de amostras avaliadas naquele trabalho.

O gene *kps* é responsável por codificar os antígenos capsulares K1 e K5. O antígeno K1 em especial está muito relacionado com ITU e acredita-se que ele interfira na ação do sistema complemento do hospedeiro favorecendo a colonização da bactéria<sup>48,49</sup>.

Trabalho realizado por Tiba et al.<sup>29</sup> demonstrou uma frequência de 36% para *kpsMTII*. Porcentagens maiores foram encontradas em Yun et al.<sup>50</sup> (84,4%), Park et al.<sup>49</sup> (82%) e Shookohi, Rashki<sup>51</sup> (98%) corroborando com os 98% de frequência encontrado no presente trabalho.

No presente trabalho foi observado uma ocorrência crescente de genes de virulência em *E. coli* isolados de urina. Outros estudos também relataram o aumento da patogenicidade e resistência de *E. coli* uropatogênica<sup>45,51</sup>. Esta característica ressalta o perfil epidemiológico dos microrganismos prevalentes na região geográfica de Presidente Prudente-SP e desperta grande preocupação uma vez que estes microrganismos podem está em fase de acumulação progressiva de fatores de virulência o que facilita a sua colonização e o aumento da gravidade da infecção no hospedeiro.

Este estudo destaca a complexidade dos biofilmes e a grande variabilidade dos resultados encontrados para a formação dos biofilmes entre os isolados. Além disso, observou-se que apesar dos indícios de que os óleos essenciais sejam promissores no combate e controle dos biofilmes, sua ação foi dependente de cada isolado. Foi notado também que existem diferentes perfis na prevalência de fatores de virulência de acordo com as regiões geográficas e surpreendentemente os isolados da região possuem uma porcentagem maior para a presença dos genes *fimH*, *fliC*, *papC* e *kpsMTII* se comparado com estudos realizados em outras localidades como Campinas, Iran, Coreia do Sul. Assim, ressaltamos a relevância dos estudos mais aprofundados para maior conhecimento a respeito do perfil epidemiológico das bactérias isoladas na região. Este processo é de grande valia para comparação entre as estirpes de várias regiões em um país, além de melhorar o gerenciamento das infecções do trato-urinário e melhorar a antibioticoterapia na região do Oeste Paulista.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro fornecido pela UNOESTE processos n° 2998 e 5156 e ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa PIBIC 118914/2016-2.

#### DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

#### REFERÊNCIAS

1. Amin M, Mehdinejad R, Pourdangchi Z. Estudo de Bactérias isoladas de infecções do trato urinário e Determinação da sua susceptibilidade a antibióticos. Jundishapur J Microbiol. 2009;2(3):118-23.
2. Sherley M, Gordon DM, Collingnon PJ. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. Microbiol. 2004; 150:1539-46. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.26773-0>
3. Silva JMP, Vasconcelos MMA, Dias CS, Vasconcelos MA, Mendonça ACQ, Froes B, Oliveira EA. Aspectos atuais no diagnóstico e abordagem da infecção do trato urinário. Rev Med Minas Gerais. 2014;24:20-30. DOI: <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20140035>
4. Lopes HV, Tavares W. Infecções do Trato Urinário: Diagnóstico. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira (AMB) e Conselho Federal de Medicina (CFM); Sociedade Brasileira de Infectologia e Sociedade Brasileira de Urologia; 2004.
5. Kuga APV, Fernandes MVL. Prevenção de Infecção do Trato Urinário (ITU) Relacionado à Assistência à Saúde. São Paulo: Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar - APECIH. 2009;2.
6. Rahn DD. Urinary tract infections: contemporary management. Urol Nurs. 2008;28:333-41.
7. Ksycki MF, Namias N. Nosocomial urinary tract infection. Surg Clin North Am. 2009;89(2):475-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2008.09.012>
8. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. N Engl J Med. 2010;362(19):1804-13. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMr0904124>
9. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(1):142-201.



10. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol*. 2012;2012:ID681473, 15p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/681473>
11. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Rev Microbiol*. 2015;13(5):269-84. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3432>
12. Pires MCS, Frota KS, Junior POM, Correia AF, Cortez-Escalante JJ, Silveira CA. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 2007;40(6):643-7. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000600009>
13. Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J*. 2005;81(952):83-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2004.023036>
14. Ronald MD. The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. *Am J Med* 2003;49(2):71-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.1067/mda.2003.8>
15. Castonguay MH, Van Der Schaaf S, Koester W, Krooneman J, Van Der Meer W, Harmsen H, Landini P. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Res Microbiol*. 2006;157(5):471-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.10.003>
16. Schembri MA, Dalsgaard D, Klemm P. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol*. 2004;186(5):1249-57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.5.1249-1257.2004>
17. Donelli G, Guaglianone E. Emerging role of *Enterococcus* spp. in catheter related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. *J Vasc*. 2004;5(1):3-9. DOI: <https://doi.org/10.1177/112972980400500101>
18. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(2):95-108. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro821>
19. Flemming HC. EPS: then and now. *Microorganisms*. 2016;4(4):41-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms4040041>
20. Marques MC. Monitorização de biofilmes de *Pseudomonas Fluorescens*. [Dissertação]. Portugal: Universidade do Minho, 2004.
21. Khardori N, Yassien M. Biofilms in device-related infections. *J Ind Microbiol*. 1995;15(3):141-7. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01569817>
22. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:187-209. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
23. Leite BA. Aderência bacteriana e formação de biofilme aos fios de dermossustentação facial. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.82.2008.tde-16102008-115949>
24. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1422-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra035415>
25. Winkelströter LK, Teixeira FBR, Silva EP, Alves VF, Martinis ECP. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microb Ecol*. 2014;68:35-46. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0347-4>
26. Kavanaugh NL, Ribbeck K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(11):4057-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07499-11>
27. Pereira AA, Piccoli RH, Batista NN, Camargos NG, Oliveira MMM. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* entérica *Enteritidis* por óleos essenciais. *Ciência Rural*. 2014;44(11):2022-8. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140092>
28. Mørretrø T, Langsrud S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*. 2004;1(2):107-21. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1479050504001322>
29. Tiba MR, Nogueira GR, Leite MS. Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli*

- strains isolated from patients with cystitis. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 2009;42(1):58-62. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000100012>
30. Santurio JM, Santurio DF, Pozzatti P, Moraes C, Franchin PR, Alves SH. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural*. 2007;37(3):803-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000300031>
31. Sambrook J, Russel WD. A laboratory manual: molecular cloning. 4.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
32. Delcaru C, Alexandru I, Podgoreanu P, Grosu M, Stavropoulos E, Chifiriuc MC, Lazar V. Microbial biofilms in urinary tract infections and prostatitis: etiology, pathogenicity, and combating strategies. *Pathogens*. 2016;5(4):65-77. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens5040065>
33. Neupane S, Khatiwada S, Chaudhary R, Banjara MR. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. *Antimic Resist Infec Control*. 2016;5:1-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-016-0104-9>
34. Blanchette-Cain K, Hinojosa CA, Akula R, Lizcano A, Gonzalez-Juarbe N, Munoz-Almagro C, Sanchez CJ, Bergman MA, Orihuela CJ. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation is strain dependent, multifactorial, and associated with reduced invasiveness and immunoreactivity during colonization. *MBio*. 2013;4(5):1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00745-13>
35. Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Soares MM, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol*. 2015;6:1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00205>
36. Krasowska A, Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infec Microbiol*. 2014;4:1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112>
37. Choi NY, Bae YN, Lee JN. Cell surface properties and biofilm formation of pathogenic bacteria. *Food Colloq Vitae* 2017 set-dez; 9(3): 13-23. DOI: 10.5747/cv.2017.v09.n3.v204 ISSN 1984-6436/© 2017 - Publicado pela Universidade do Oeste Paulista. Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
- Sci Biotechnol. 2015;24(5):2257-64. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0301-y>
38. Batista NN, Camargos NG, Oliveira MMM, Piccoli RH. Formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável em contato com leite e seu controle por óleos essenciais. *Braz J Food Nutr*. 2014;25(1):19-24.
39. Lameu GS. Efeito de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Iliicum verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* em biofilmes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis em cupons de aço inoxidável. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ SP, 2014.
40. Nikolić M, Vasić S, Đurđević J, Stefanović O, Čomić L. Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber officinale* (Roscoe)) ethanolic extract. *Kragujevac J Sci*. 2014;36:129-36. DOI: <https://doi.org/10.5937/KgJSci1436129N>
41. Andrade MA, Cardoso MG, Batista LR, Mallet ACT, Machado SMF. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Rev Ciência Agrônôm*. 2012;45(2):399-408. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000200025>
42. Goulter RM, Gentle IR, Dykes GA. Characterisation of Curli Production, Cell Surface Hydrophobicity, Autoaggregation and Attachment Behaviour of *Escherichia coli* O157. *Curr Microbiol*. 2010;61(3):157-62. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9589-2>
43. Tiba MR, Yano T, Leite DS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Tropical*. 2008;50(5):255-60. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000500001>
44. Hojati Z, Zamanzad B, Hashemzadeh M, Molaie R, Gholipour A. The FimH gene in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(2):1-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.5812/jjm.17520>
45. Tabasi M, Karam MR, Habibi M, Mostafavi E, Bouzari S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from patients with acute cystitis, pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria. *J Clin Diagnostic Res*.

- 2016;10(12):DC01-DC07. DOI: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/21379.9009>
46. Moura C, Tiba MR, Silva MJ, Leite DS. Identification of new flagellin-encoding *fliC* genes in *Escherichia coli* isolated from domestic animals using RFLP-PCR and sequencing methods. *Pesq Vet Bras.* 2013;33(4):417-22. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400001>
47. Norgren M, Norgren M, Bága M, Tennent JM, Normark S. Nucleotide sequence, regulation and functional analysis of the *papC* gene required for cell surface localization of Pap pili of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1987;1(2):169-178. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1987.tb00509.x>
48. Devine, Roberts AP. k1, k5 and O antigens of *Escherichia coli* in relation to serum killing via the classical and alternative complement pathways. *J Med Microbiol.* 1993;4:139-44.
49. Park HK, Jung YJ, Chae HC, Shin YJ, Woo SY, Park HS, Lee SJ. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43(1):51-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00365590802299338>
50. Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *J Microbiol Immunol Infection.* 2016; 47:455-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2013.07.010>
51. Shookohi M, Rashki A. Prevalence of toxigenic genes in *Escherichia coli* isolates from hospitalized patients in Zabol, Iran. *Int J Enteric Pathog.* 2016;4(1):11-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.17795/ijep29222>

Recebido para publicação em 15/08/2017

Revisado em 01/09/2017

Aceito em 05/09/2017