



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR – CEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**Avaliação de anticorpos policlonais com potencial uso em diagnóstico de
infecções do trato urinário**

Discente: Éryca Mendes de Araujo

Orientadora: Profa. Dra. Ana Flávia Alves Parente

Brasília – DF

2026

Éryca Mendes de Araujo

**Avaliação de anticorpos policlonais com potencial uso em diagnóstico de
infecções do trato urinário**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Flávia Alves Parente.

Brasília - DF

2026

A Deus, a quem pertence toda honra e glória, dedico esta dissertação. *“Porque Dele, e por Ele e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém!”* (Romanos 11:36).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por Sua infinita bondade e misericórdia, por ter me sustentado e guiado durante toda esta jornada.

À minha mãe, Rosilene, ao meu pai, Edilson, *in memoriam*, à minha irmã, Elaine, e ao Isaque, expresso minha mais profunda e eterna gratidão pelo amor, pelo carinho, pelas palavras de incentivo, pela paciência e pelo apoio incondicional que foram essenciais ao longo desta trajetória.

Agradeço ao Mateus Francisco, do Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos (LAMP), pela parceria diária e por toda a ajuda ao longo do caminho. À Viviane Ribeiro, da Universidade Federal de Goiás (UFG), sou grata pelo auxílio e pela paciência ao me ensinar os procedimentos experimentais fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Aimê Fonseca, do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos (LBMFP), por me acompanhar no início dos experimentos, momento em que ainda não me sentia plenamente segura, e por contribuir para que eu adquirisse a confiança necessária para dar continuidade ao trabalho. Estendo meus agradecimentos ao Namuhell e à Professora Dra. Ildinete Silva, também do LBMFP, pelo suporte essencial a este trabalho, especialmente pela gentileza em ceder a *cepa* ATCC de *Candida albicans* utilizada nos estudos.

Expresso meu sincero agradecimento a todos os colegas do LAMP e do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) pela colaboração, convivência e pelos momentos de descontração que tornaram o ambiente mais leve.

À professora Dra. Tatiana Amábile, à professora Dra. Bruna Fuga e ao professor Dr. Vicente Martins, agradeço profundamente pelo apoio constante, pela generosidade em ceder o LAMP para a realização dos meus experimentos e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Registro minha profunda gratidão à professora Dra. Juliana Alves Parente Rocha e ao seu grupo de pesquisa da UFG, pelo acolhimento, pelo treinamento e pela

generosa cessão dos anticorpos anti-epítomos, que foram indispensáveis para o desenvolvimento deste estudo.

À minha orientadora, professora Dra. Ana Flávia Alves Parente, minha mais sincera gratidão. Obrigada por me acolher com tanta sensibilidade, por renovar minha esperança nos momentos mais difíceis e por ser um exemplo de profissionalismo e humanidade. Agradeço a confiança, paciência e por todos os ensinamentos. Sou imensamente grata por sua dedicação e cuidado em cada etapa desta trajetória.

Expresso minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana pelo apoio e pela oportunidade de realizar este projeto.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília (UnB) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio financeiro, fundamental para a realização desta pesquisa.

RESUMO

As infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as mais comuns na prática clínica e configuram um importante problema de saúde pública. Estimativas apontam que, em 2019, aproximadamente 400 milhões de casos de ITUs foram registrados em todo o mundo. Frequentemente causadas por bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus saprophyticus*, essas infecções estão cada vez mais associadas ao aumento da resistência aos antimicrobianos. O tempo necessário para o diagnóstico utilizando métodos convencionais é considerável, muitas vezes levando ao início empírico do tratamento, geralmente com o uso de antibióticos de amplo espectro, tal conduta contribui para o aumento da resistência antimicrobiana, que representa um dos principais problemas de saúde pública atualmente. Considerando a necessidade de métodos diagnósticos mais rápidos, este trabalho investigou a capacidade de três anticorpos policlonais, desenvolvidos a partir de três epítopos distintos de proteínas associadas à parede celular de *S. saprophyticus*, em reconhecer outras bactérias uropatogênicas. Para isso, isolados de *E.coli*, *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *P. mirabilis* foram submetidos ao protocolo adaptado da técnica *On-Cell Western*, a qual envolve incubação com anticorpos primários e secundários diretamente em células intactas, sem a necessidade de extração proteica, seguida de detecção por quimioluminescência. Os resultados demonstraram que os anticorpos foram capazes de reconhecer *E.coli*, *K. pneumoniae* e *K. variicola*, sugerindo que os epítopos utilizados, são estruturalmente conservados entre elas. A avaliação experimental de *P. mirabilis*, por sua vez, exigiu interpretação cautelosa, devido à presença de sinal no controle negativo. Quando aplicados à *Candida albicans*, microrganismo que pode integrar a microbiota humana e atuar como uropatógeno oportunista em situações de desequilíbrio imunológico, não foi observado reconhecimento, o que reforça a especificidade dos anticorpos para antígenos de origem bacteriana. Em conjunto, os achados obtidos reforçam a relevância da abordagem imunodiagnóstica baseada em anticorpos como estratégia promissora para a detecção de bactérias uropatogênicas e para o desenvolvimento futuro de métodos diagnósticos mais rápidos aplicados às ITUs, com possíveis contribuições para a melhoria da conduta clínica e para a promoção do uso racional de antimicrobianos.

Palavras-chave: Infecções do trato urinário; bactérias uropatogênicas; imunodiagnóstico.

ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) are among the most common infections in clinical practice and represent a major public health concern. Estimates indicate that, in 2019, approximately 400 million cases of UTIs were reported worldwide. Frequently caused by bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, and *Staphylococcus saprophyticus*, these infections have become increasingly associated with the rise in antimicrobial resistance. The time required for diagnosis using conventional methods is considerable, often leading to the empirical initiation of treatment, generally with broad-spectrum antibiotics; this practice contributes to the increase in antimicrobial resistance, which currently represents one of the main public health problems worldwide. Considering the need for faster diagnostic methods, this study investigated the ability of three polyclonal antibodies, developed from three distinct epitopes of *S. saprophyticus* cell wall-associated proteins, to recognize other uropathogenic bacteria. To this end, isolates of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. variicola*, and *P. mirabilis* were subjected to an adapted *On-Cell Western* protocol, which involves incubation with primary and secondary antibodies directly on intact cells, without the need for protein extraction, followed by chemiluminescent detection. The results demonstrated that the antibodies were able to recognize *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *K. variicola*, suggesting that the epitopes used are structurally conserved among these species. The experimental evaluation of *P. mirabilis*, in turn, required cautious interpretation due to the presence of signal in the negative control. When applied to *Candida albicans*, a microorganism that may be part of the human microbiota and act as an opportunistic uropathogen under conditions of immunological imbalance, no recognition was observed, reinforcing the specificity of the antibodies for antigens of bacterial origin. Taken together, these findings highlight the relevance of an antibody-based immunodiagnostic approach as a promising strategy for the detection of uropathogenic bacteria and for the future development of faster diagnostic methods for UTIs, with potential contributions to improved clinical management and to the promotion of the rational use of antimicrobials.

Keywords: Urinary tract infections; uropathogenic bacteria; immunodiagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência de infecções do trato urinário (ITUs) entre 1990 e 2019, segundo sexo e índice sociodemográfico (SDI). O gráfico de área representa o número absoluto de casos incidentes de ITU por ano, estratificado por sexo e categorias de SDI, enquanto a linha apresenta a taxa de incidência padronizada por idade (ASIR) por 100.000 habitantes..... 18

Figura 2 - Patogênese das infecções do trato urinário. a. Representação esquemática das principais etapas de uma ITU: (1) contaminação da região periuretral por uropatógenos intestinais; (2) colonização da uretra e migração para a bexiga; (3) adesão e invasão do urotélio; (4) resposta inflamatória com infiltração de neutrófilos; (5) multiplicação bacteriana e subversão do sistema imune; (6) formação de biofilme; (7) produção de toxinas e proteases que induzem danos às células hospedeiras; (8) ascensão ao trato urinário superior; (9) colonização dos rins; (10) produção de toxinas bacterianas e danos ao tecido hospedeiro; (11) se não tratada, a infecção pode progredir para bacteremia ao cruzar a barreira de células epiteliais tubulares. b. Infecção associada a um cateter, destaca-se a deposição de fibrinogênio diretamente na superfície do dispositivo, facilitando a formação de biofilmes e, conseqüentemente a infecção..... 22

Figura 3 - Patógenos resistentes classificados por nível de letalidade. FQR, resistente a fluoroquinolonas; 3GCR, resistente a cefalosporinas de terceira geração; CR, resistente a carbapenêmicos; Pen-R, resistente à penicilina; VR, resistente à vancomicina; Macro-R, resistente a macrolídeos; Amp-R *H. influenzae*, *Haemophilus influenzae* resistente à ampicilina..... 29

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia *On-Cell Western*. As etapas incluem diluições seriadas, bloqueio com BSA 1%, lavagens com PBS-Tween 20, incubação com anticorpos primários e secundário, adição do substrato ECL e detecção por quimioluminescência. 48

Figura 5 - Detecção de células intactas de *E.coli* (A), *K. pneumoniae* (B) e *K.variicola* (C) por meio dos anticorpos anti-epítipo 1 (AE1), 2 (AE2) e 3 (AE3), utilizando a técnica de *On-Cell Western*. CN corresponde ao Controle Negativo, no qual o anticorpo primário não foi adicionado. Os anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:2000, e todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado à enzima

peroxidase, proveniente do kit ECL, diluído a 1:4000. A visualização foi realizada por quimioluminescência, e as imagens foram adquiridas com o equipamento L-Pix Chemi com exposição de 20 minutos em cada experimento.....65

Figura 6 - Intensidade relativa do sinal quimioluminescente obtido no ensaio de *On-cell Western* para os isolados bacterianos incubados com o anticorpo AE1 ao longo de diluições seriadas celulares. (A) *Escherichia coli*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Klebsiella variicola*. Os valores foram obtidos por análise densitométrica no software ImageJ/Fiji, corrigidos pelo controle negativo e normalizados em relação ao maior sinal de cada réplica biológica, definido como 100%.66

Figura 7 - Intensidade relativa do sinal quimioluminescente obtido no ensaio de *On-cell Western* para os isolados bacterianos incubados com o anticorpo AE2 ao longo de diluições seriadas celulares. (A) *Escherichia coli*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Klebsiella variicola*. Os valores foram obtidos por análise densitométrica no software ImageJ/Fiji, corrigidos pelo controle negativo e normalizados em relação ao maior sinal de cada réplica biológica, definido como 100%.67

Figura 8 - Intensidade relativa do sinal quimioluminescente obtido no ensaio de *On-cell Western* para os isolados bacterianos incubados com o anticorpo AE3 ao longo de diluições seriadas celulares. (A) *Escherichia coli*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Klebsiella variicola*. Os valores foram obtidos por análise densitométrica no software ImageJ/Fiji, corrigidos pelo controle negativo e normalizados em relação ao maior sinal de cada réplica biológica, definido como 100%.68

Figura 9 - Sinal quimioluminescente obtido no ensaio de *On-Cell Western* para avaliação do limite de detecção do anticorpo AE1 frente ao isolado *Escherichia coli* 104. O ensaio foi realizado em triplicata técnica, utilizando diluições seriadas do anticorpo de 1:2.000 a 1:64.000. CN: controle negativo. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, proveniente do kit ECL, diluído a 1:4000. A visualização foi realizada por quimioluminescência, e as imagens foram adquiridas com o equipamento L-Pix Chemi com exposições entre 10 segundos e 3 minutos em cada experimento.74

Figura 10 - Limite de detecção do anticorpo AE1 por análise densitométrica semiquantitativa. Valores de *mean gray* corrigido obtidos por ImageJ/Fiji para as diferentes diluições do anticorpo AE1, em triplicata técnica, frente ao isolado *Escherichia coli* 104. O *mean gray* corrigido corresponde à intensidade média do sinal

quimioluminescente de cada poço após subtração do valor do controle negativo da mesma réplica. Os pontos representam os valores individuais das réplicas técnicas; a barra horizontal indica a média e as barras verticais, o desvio-padrão.....75

Figura 11 - Detecção de *Escherichia coli* cultivada em urina por *On-Cell Western* utilizando o anticorpo AE1. Células de *E. coli* cultivadas em urina foram submetidas ao ensaio em série de diluições de $1:10^1$ a $1:10^{15}$. CN1: controle negativo sem anticorpo primário. CN2: urina filtrada sem inoculação bacteriana, incubada com anticorpo primário e secundário. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, proveniente do kit ECL, diluído a 1:4000. A visualização foi realizada por quimioluminescência, e as imagens foram adquiridas com o equipamento L-Pix Chemi com exposições entre 10 segundos e 3 minutos em cada experimento.....77

Figura 12 - Detecção de células intactas de *C. albicans* por meio dos anticorpos anti-epítipo 1 (AE1), 2 (AE2) e 3 (AE3), utilizando a técnica de *On-Cell Western*. (A) Imagem com sobreposição de luz visível e quimioluminescência; (B) Imagem de quimioluminescência pura da mesma placa. CN corresponde ao Controle Negativo, no qual o anticorpo primário não foi adicionado. Os anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:2000, e todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, proveniente do kit ECL, diluído a 1:4000. A visualização foi realizada por quimioluminescência, e as imagens foram adquiridas com o equipamento L-Pix Chemi com exposição de 20 minutos em cada experimento.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo entre métodos diagnósticos tradicionais e inovadores para ITUs.....	35
Tabela 2 - Número de acesso, nome das proteínas e respectivas sequências de epítomos usados no estudo.	43
Tabela 3 - Conservação do epítopo E1 entre diferentes uropatógenos.	56
Tabela 4 - Conservação do epítopo E2 entre diferentes uropatógenos.	59
Tabela 5 - Conservação do epítopo E3 entre diferentes uropatógenos.	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3GCR: Resistant to Third-Generation Cephalosporins (Resistente a cefalosporinas de terceira geração)

Aas: Autolysin Adhesion Surface Protein (Proteína de adesão autolisina de superfície)

AE: Anticorpo Anti-Epítipo

AMR: Antimicrobial Resistance (Resistência antimicrobiana)

Ampi-R: Resistente à Ampicilina

BHI: *Brain Heart Infusion* (Infusão cérebro-corção)

BLOSUM62: *Blocks of Amino Acid Substitution Matrix* (Matriz de Substituição de Blocos de Aminoácidos)

BPPL: Bacterial Priority Pathogens List (Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários)

CBIs: Comunidades Bacteriana Intracelulares

CgoX: Coproporfirinogênio oxidase

CHAP: Cysteine, Histidine-Dependent Amidohydrolases/Peptidases
(Amidohidrolases/peptidases dependentes de cisteína e histidina)

CN: Controle Negativo

CPS: Capsular Polysaccharide (Polissacarídeo capsular)

CR: Resistente a Carbapenêmicos

DO: Densidade Óptica

E: Epítomos

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

ECL: Enhanced Chemiluminescence (Quimioluminescência aprimorada)

EHEC: *Escherichia coli* entero-hemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

GBD 2019: Global Burden of Disease Study 2019 (Estudo Global de Carga de Doenças 2019)

HpmA: Hemolisina

HUB/UnB: Hospital Universitário de Brasília/Universidade de Brasília

ICW: *In-Cell Western*

ITU: Infecção do Trato Urinário

ITUAC: Infecções do Trato Urinário Associadas a Cateter

LAMP-1: Proteína 1 de Membrana Associada ao Lisossomo

LAMP/IB-UnB: Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília

LBMFP/IB-UnB: Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília

LC-MS: Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas)

LPS: Lipopolysaccharide (Lipopolissacarídeo capsular)

mAbs: Anticorpos monoclonais

Macro-R: Resistente a Macrolídeos

MDR: Multidrug-Resistant Microorganism (Microorganismo multirresistente)

MS: Mass Spectrometry (Espectrometria de massa)

NGS: Next-Generation Sequencing (Sequenciamento de próxima geração)

NMEC: Meningite neonatal *E. coli*

NPV: Negative Predictive Value (Valor preditivo negativo)

OCW: *On-Cell Western*

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

Pen-R: Resistente à Penicilina

POC: Point-of-Care Diagnosis (Diagnóstico no ponto de atendimento)

Pta: *Proteus* Toxic Agglutinin (Aglutinina tóxica de *Proteus*)

Sdrl: Serine-Aspartate Repeat Protein I (Proteína de repetição serina-aspartato I)

SHU: Síndrome Hemolítica e Urêmica

TI: Teste Imunocromatográfico Rápido

TPI: Triose-fosfato isomerase

TSA: Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

Uaf: Urothelium-Adhesive Factor (Fator adesivo do urotélio)

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFG: Universidade Federal de Goiás

UnB: Universidade de Brasília

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica

UTIs: Unidades de Terapia Intensiva

VR: Resistente à Vancomicina

WHO: World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	CLASSIFICAÇÃO E PATOGÊNESE DAS ITUs	20
1.2	BACTÉRIAS COMUMENTE ASSOCIADAS ÀS ITUs	23
1.3	DIAGNÓSTICO EM ITUs	30
1.3.1	<i>Populações vulneráveis e novas abordagens diagnósticas nas ITUs</i>	32
2	JUSTIFICATIVA.....	39
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	METODOLOGIA.....	42
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS	42
4.2	CEPA DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	42
4.3	SÍNTESE DE EPÍTOPOS E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS (AE) ..	42
4.4	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS EPÍTOPOS	44
4.5	DETECÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS INTACTAS POR <i>ON-CELL WESTERN</i>	44
4.5.1	<i>Cultivo Bacteriano e Preparo das Amostras</i>	45
4.5.2	<i>Diluição Seriada da Suspensão Bacteriana</i>	46
4.5.3	<i>Bloqueio das Amostras</i>	46
4.5.4	<i>Lavagem das Amostras</i>	46
4.5.5	<i>Incubação com o Anticorpo Primário</i>	47
4.5.6	<i>Lavagem Após Incubação com Anticorpo Primário</i>	47
4.5.7	<i>Incubação com Anticorpo Secundário</i>	47
4.5.8	<i>Lavagem Após Incubação com Anticorpo Secundário</i>	47
4.5.9	<i>Detecção</i>	48
4.6	ANÁLISE DENSITOMÉTRICA SEMIQUANTITATIVA DAS IMAGENS DE <i>ON-CELL WESTERN</i>	49
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50

4.8	AVALIAÇÃO DA FAIXA DE DETECÇÃO DO ANTICORPO AE1 POR <i>ON-CELL</i>	
<i>WESTERN</i>		50
4.9	DETECÇÃO DIRETA DE BACTÉRIAS CULTIVADAS EM URINA POR <i>ON-CELL</i>	
<i>WESTERN</i>		51
4.9.1	<i>Coleta das amostras de urina</i>	51
4.9.2	<i>Cultivo dos microrganismos em urina</i>	51
4.9.3	<i>Curva de crescimento bacteriano em urina</i>	52
4.9.4	<i>Deteção</i>	52
4.10	AVALIAÇÃO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC 5314 COMO POSSÍVEL CONTROLE NEGATIVO POR <i>ON-CELL WESTERN</i>	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA CONSERVAÇÃO DOS EPÍTOPOS POR BLASTp	53
5.1.1	<i>Considerações sobre limitações do banco de dados / curadoria taxonômica</i>	64
5.2	OS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-EPÍTOPOS DEMONSTRARAM CAPACIDADE DE RECONHECER CÉLULAS INTACTAS DE <i>E. COLI</i> , <i>K. PNEUMONIAE</i> E <i>K. VARIICOLA</i>	64
5.2.1	<i>Considerações sobre a avaliação experimental de Proteus mirabilis</i>	72
5.3	DELIMITAÇÃO EXPERIMENTAL DA FAIXA DE DETECÇÃO DO ANTICORPO AE1 POR TITULAÇÃO EM <i>ON-CELL WESTERN</i>	73
5.4	DETECÇÃO DIRETA DE BACTÉRIAS CULTIVADAS EM URINA POR <i>ON-CELL WESTERN</i>	76
5.5	AUSÊNCIA DE RECONHECIMENTO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> PELOS ANTICORPOS ANTI-EPÍTOPOS	79
6	CONCLUSÃO	81
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITUs) são um desafio de saúde global, figurando entre as infecções mais frequentes e acometendo milhões de pessoas em todo o mundo (Öztürk; Murt, 2020). Podem ocorrer em ambientes hospitalares ou na comunidade, apresentando manifestações clínicas que vão desde leve desconforto até complicações graves, como a sepse (Steiger; Comito; Nicolau, 2017). Ilustrando essa gravidade potencial, um estudo abrangente que analisou mais de 422 mil hospitalizações por sepse grave ou choque séptico identificou que, em 42% dos casos, a ITU foi o foco infeccioso primário (Hatfield et al., 2018).

De acordo com estimativas do *Global Burden of Disease Study 2019* (GBD 2019), um estudo colaborativo que avalia a carga global de doenças, as ITUs foram responsáveis, nesse ano, por aproximadamente 404,6 milhões de casos e 236.790 óbitos em todo o mundo. O estudo revelou ainda que as mulheres apresentam uma probabilidade 3,6 vezes maior de desenvolver uma ITU em comparação aos homens da mesma idade (Yang et al., 2022). Embora as maiores taxas de incidência padronizada por idade (ASIR) sejam observadas em regiões de alto índice sociodemográfico (SDI), a mortalidade e a carga das ITUs, em anos de vida ajustados por incapacidade permanecem particularmente elevadas em países de baixo e baixo-médio SDI, refletindo desigualdades no acesso ao diagnóstico e ao tratamento (Yang et al., 2022), o que se traduz em significativo impacto clínico para os pacientes e econômico para os serviços de saúde, dado o custo elevado com internações, exames diagnósticos e tratamento prolongado (Steiger; Comito; Nicolau, 2017). Esses achados são ilustrados na Figura 1, que apresenta a incidência de ITUs entre 1990 e 2019, estratificada por sexo e categorias de SDI (Yang et al., 2022).

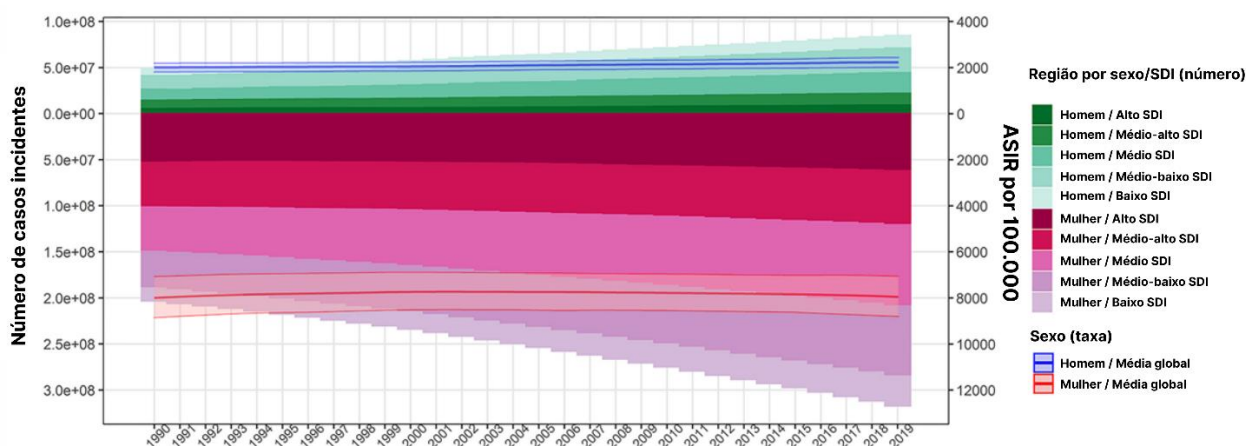


Figura 1 - Incidência de infecções do trato urinário (ITUs) entre 1990 e 2019, segundo sexo e índice sociodemográfico (SDI). O gráfico de área representa o número absoluto de casos incidentes de ITU por ano, estratificado por sexo e categorias de SDI, enquanto a linha apresenta a taxa de incidência padronizada por idade (ASIR) por 100.000 habitantes.

Fonte: Adaptado de Yang et al. (2022).

Conforme evidenciado na Figura 1, a incidência absoluta de casos de ITUs mostrou um aumento progressivo entre 1990 e 2019 (Yang 2022). Entretanto, esse crescimento ocorreu em paralelo a uma taxa de incidência padronizada por idade (ASIR) relativamente estável (Yang et al., 2022). De acordo com as análises estratificadas por idade e índice sociodemográfico apresentadas por Yang et al., (2022), esse aumento absoluto de casos está fortemente associado ao crescimento e ao envelhecimento da população mundial, com maior impacto em sociedades com maior expectativa de vida, em decorrência do envelhecimento populacional (Yang et al., 2022). Além disso, a incidência permanece sistematicamente mais elevada em mulheres, o que se relaciona, em grande parte, a fatores anatômicos e fisiológicos: a uretra feminina, mais curta e próxima da região anal, favorece o acesso bacteriano ao trato urinário (Vasudevan, 2014). Estima-se que cerca de 50% das mulheres apresentarão pelo menos um episódio de ITU ao longo da vida (Foxman, 2002).

O desequilíbrio da microbiota vaginal “saudável”, geralmente caracterizado pela redução de *Lactobacillus* spp., gênero responsável pela produção de ácido lático que reduz o pH vaginal e previne a proliferação de bactérias uropatogênicas, também tem sido associado à maior susceptibilidade às ITUs (Greenbaum et al., 2019; Stapleton et al., 2011). Ademais, alterações hormonais ao longo da vida reprodutiva feminina também modulam o risco de ITU. Na gestação, a dilatação ureteral induzida pela progesterona, combinada com a compressão mecânica do ureter pelo útero

gravídico, leva ao aumento do volume residual na bexiga e à estase urinária, favorecendo refluxo vesicoureteral e a ocorrência da infecção (American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), 2023). Na pós-menopausa, por outro lado, a redução dos níveis de estrogênio leva à menor produção de glicogênio no epitélio vaginal, à elevação do pH e à redução das espécies de *Lactobacillus* spp., aumentando a susceptibilidade a ITUs (Anton et al., 2025). Outros fatores, como histórico prévio de ITU, uso de cateteres urinários, condições metabólicas como o diabetes e estados de imunossupressão, também contribuem para elevar o risco de infecção (Timm; Russell; Hultgren, 2025).

Do ponto de vista econômico, as ITUs representam um grande desafio, especialmente para a saúde pública, em razão dos custos associados ao manejo dessas infecções (Steiger; Comito; Nicolau, 2017). Esse impacto financeiro torna-se ainda mais expressivo quando o quadro clínico é complicado por desfechos graves, como sepse, necessidade de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) ou falha terapêutica, situações em que se observam aumento nas taxas de hospitalização e prolongamento da permanência hospitalar, frequentemente relacionados à crescente prevalência de isolados bacterianos resistentes aos antimicrobianos (Steiger; Comito; Nicolau, 2017). Para exemplificar, apenas em 2018, os Estados Unidos registraram 2.837.385 hospitalizações com diagnóstico de ITU (Zilberberg et al., 2022), e nesse contexto, Carreno et al. (2019) estimaram que os custos medianos em 30 dias para pacientes hospitalizados por ITU complicada alcançaram aproximadamente US\$ 13.000 por caso, considerando despesas registradas nos planos de saúde norte-americanos (Carreno et al., 2019). Já no Brasil, um estudo observacional baseado nos dados do Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/DATASUS) identificou, entre 2018 e 2022, 75.213 internações por cistite (infecções isoladas da bexiga), com predomínio no sexo feminino (64,7%), maior frequência em idosos, média de permanência hospitalar de 4,8 dias e maior concentração de registros na região Sudeste (30,5%) (Moura et al., 2024).

Além dos indicadores de internação e dos custos diretos, as ITUs recorrentes também afetam a qualidade de vida. Em mulheres atendidas em ambulatório no Brasil, a presença de infecções urinárias recorrentes esteve associada a piores escores de qualidade de vida, principalmente nos domínios físico e psicológico, com redução de energia, pior autoestima e menor participação em atividades de lazer (Lourenção et

al., 2024). Considera-se infecção do trato urinário recorrente a ocorrência de três episódios de ITU com culturas de urina positivas nos últimos 12 meses ou de dois episódios nos últimos seis meses (Malik; Wu; Zimmermann, 2018). Embora os dados disponíveis provavelmente subestimem o real fardo das ITUs, o impacto destas infecções sobre os indivíduos, sociedade e sistema de saúde é evidente (Timm; Russell; Hultgren, 2025).

1.1 Classificação e Patogênese das ITUs

As ITUs correspondem a processos infecciosos que desencadeiam reações inflamatórias em diferentes segmentos do trato urinário, sendo geralmente classificadas como superiores ou inferiores, de acordo com a localização anatômica da infecção (Mancuso et al., 2024). Entre as formas clínicas mais comuns estão a uretrite, que afeta a uretra; a cistite, restrita à bexiga e associada a sintomas como disúria, urgência e frequência urinária aumentadas, além de desconforto suprapúbico; e a pielonefrite, que acomete os rins e se caracteriza por febre, calafrios e dor no flanco (Klein; Hultgren, 2020). Embora as ITUs sejam predominantemente de etiologia bacteriana, também podem ser causadas por agentes fúngicos, parasitários ou virais (Amdekar; Singh; Singh, 2011).

Clinicamente, essas infecções são ainda classificadas como não complicadas ou complicadas. De modo geral, ITUs não complicadas ocorrem em indivíduos saudáveis, sem anormalidades estruturais ou disfunções neurológicas que comprometam o trato urinário (Hooton, 2012). Em contraste, as ITUs complicadas são aquelas associadas a alterações anatômicas ou funcionais do trato geniturinário, à presença de comorbidades ou fatores de risco que aumentam a probabilidade de infecção, como cateterização urinária, anormalidades metabólicas ou neurológicas que afetam o trato urinário, interrupção do fluxo urinário normal (por exemplo, por obstrução ou retenção urinária), imunossupressão ou gravidez (Hooton, 2012).

Em geral, as ITUs se iniciam com a contaminação da região periuretral por uropatógenos provenientes do intestino (Flores-Mireles et al., 2015). A partir da

fixação do microrganismo na superfície epitelial, ocorre a colonização da uretra e, posteriormente, a migração em direção à bexiga, processo que depende da expressão de estruturas de motilidade, como flagelos e fatores de adesão, como *pili* (fímbrias) (Flores-Mireles et al., 2015). Uma vez na bexiga, o desfecho da infecção dependerá das interações complexas entre o patógeno e as defesas do hospedeiro, que determinarão se os microrganismos serão eliminados pela micção e pela resposta imune ou se conseguirão estabelecer-se e colonizar o local (Flores-Mireles et al., 2015). Caso a colonização se consolide, as bactérias se aderem ao urotélio, invadem as células uroteliais superficiais, multiplicam-se e desencadeiam uma resposta inflamatória intensa, mediada principalmente por neutrófilos (Flores-Mireles et al., 2015; Klein; Hultgren, 2020).

Alguns patógenos, entretanto, são capazes de subverter essas defesas por meio da produção de toxinas, sideróforos, adesinas e pela formação de biofilmes, o que favorecem sua multiplicação, persistência e evasão da resposta imune no trato urinário (Flores-Mireles et al., 2015; Timm; Russell; Hultgren, 2025). Quando essas barreiras protetoras são vencidas, os microrganismos podem ascender para o trato urinário superior, alcançando os rins e ocasionando pielonefrite. Em casos mais graves e se não tratados adequadamente, a infecção pode progredir para bacteremia, com potencial risco de sepse (Figura 2) (Flores-Mireles et al., 2015).

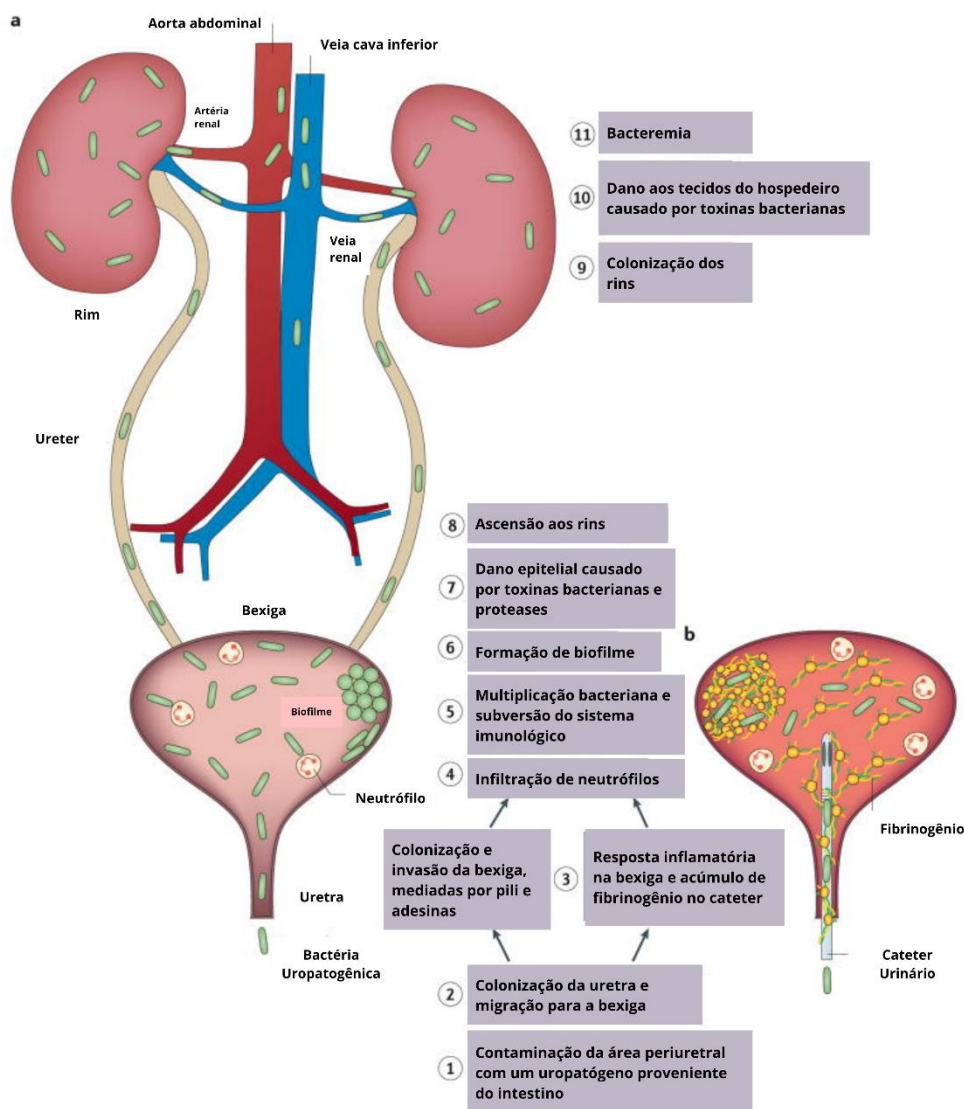


Figura 2 - Patogênese das infecções do trato urinário. **a.** Representação esquemática das principais etapas de uma ITU: (1) contaminação da região periuretral por uropatógenos intestinais; (2) colonização da uretra e migração para a bexiga; (3) adesão e invasão do urotélio; (4) resposta inflamatória com infiltração de neutrófilos; (5) multiplicação bacteriana e subversão do sistema imune; (6) formação de biofilme; (7) produção de toxinas e proteases que induzem danos às células hospedeiras; (8) ascensão ao trato urinário superior; (9) colonização dos rins; (10) produção de toxinas bacterianas e danos ao tecido hospedeiro; (11) se não tratada, a infecção pode progredir para bacteremia ao cruzar a barreira de células epiteliais tubulares. **b.** Infecção associada a um cateter, destaca-se a deposição de fibrinogênio diretamente na superfície do dispositivo, facilitando a formação de biofilmes e, consequentemente a infecção.

Fonte: Adaptado de Flores-Mireles et al., 2015.

A sequência temporal desses eventos foi caracterizada em maior detalhe em modelos murinos de infecção por *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC). Em modelos experimentais de cistite, Mulvey et al. (1998) demonstraram, por meio da quantificação seriada de unidades formadoras de colônia (UFC) intracelulares resistentes ao tratamento com gentamicina, que, nas primeiras horas após a inoculação, as bactérias

aderem ao urotélio vesical, invadem as células uroteliais superficiais e passam progressivamente a localizar-se em compartimentos intracelulares, de modo que, por volta de 12 horas pós-infecção, a maior parte da carga bacteriana remanescente na bexiga já se encontra em localização intracelular, organizada em comunidades bacterianas intracelulares (CBIs) (Mulvey et al., 1998; Mysorekar; Hultgren, 2006). Nos dias subsequentes, a resposta imune e a micção contribuem para a eliminação das bactérias livres no lúmen vesical, de modo que muitos animais apresentam cultura-negativa, sugerindo resolução da infecção, embora persistam focos de bactérias viáveis no epitélio (Mulvey et al., 1998; Mysorekar; Hultgren, 2006).

A partir de cerca de duas semanas pós-infecção, esses focos residuais são observados como pequenos agrupamentos de UPEC em vesículas endossomais positivas para Proteína 1 de Membrana Associada ao Lisossomo (Lamp-1), caracterizando reservatórios intracelulares quiescentes capazes de permanecer por várias semanas no urotélio, mesmo na ausência de bacteriúria detectável, isto é, de bactérias viáveis na urina identificadas por cultura quantitativa, ou de sinais clínicos evidentes (Mysorekar; Hultgren, 2006). Quando a renovação epitelial é experimentalmente induzida nesse período, ocorre reemergência rápida de bacteriúria e inflamação vesical, mimetizando episódios de recorrência a partir desses reservatórios (Mysorekar; Hultgren, 2006). Esses achados sustentam o modelo em que a ITU por UPEC não é apenas um evento agudo autolimitado, mas pode evoluir para um estado de persistência intracelular com potencial para recidivas ao longo do tempo (Mysorekar; Hultgren, 2006).

1.2 Bactérias comumente associadas às ITUs

Diversas bactérias, incluindo espécies Gram-negativas e Gram-positivas, podem causar ITUs, sendo *E. coli* uropatogênica (UPEC) o patógeno mais frequentemente envolvido (Flores-Mireles et al., 2015). Estima-se que UPEC seja responsável por aproximadamente 75% das ITUs não complicadas e cerca de 65%

das ITUs complicadas (Flores-Mireles et al., 2015; Timm; Russell; Hultgren, 2025). Entre os demais uropatógenos bacterianos, destacam-se espécies dos gêneros *Klebsiella* (como *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella variicola*), *Proteus*, em especial *Proteus mirabilis*, e *Staphylococcus saprophyticus* (Amdekar; Singh; Singh, 2011; Yelin et al., 2019). Em cenários específicos, sobretudo em ITUs complicadas ou associadas a dispositivos, outros microrganismos, como *Enterococcus faecalis* e outras espécies de *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* do grupo B, *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp., também podem atuar como agentes etiológicos (Flores-Mireles et al., 2015). Grande parte desses uropatógenos utilizam mecanismos de virulência comuns, como adesinas, flagelos, sistemas de aquisição de íons metálicos, toxinas e formação de biofilmes, que favorecem a colonização do trato urinário e a persistência da infecção (Flores-Mireles et al., 2015; Timm; Russell; Hultgren, 2025).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, comum da microbiota intestinal humana (Denamur et al., 2021). Cepas comensais raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou em situações em que há algum comprometimento das barreiras gastrointestinais (Kaper; Nataro; Mobley, 2004). Entretanto, determinadas linhagens de *E. coli* adquiriram conjuntos específicos de fatores de virulência que lhes permitem causar tanto doenças extraintestinais, como ITUs, infecções pulmonares, de pele e bacteremia, quanto infecções intestinais, incluindo quadros de diarreia e síndrome hemolítico-urêmica (SHU) (Denamur et al., 2021).

Com base nos mecanismos de virulência e nas manifestações clínicas no hospedeiro, as linhagens patogênicas de *E. coli* são tradicionalmente agrupadas em diferentes patótipos, entre os quais se destacam: I. *E. coli* enteropatogênica (EPEC) – associada à diarreia infantil e em animais; II. *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) – responsável por colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (SHU); III. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) – causa da diarreia do viajante e de diarreia em suínos e bovinos; IV. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) – associada a diarreia persistente em humanos; V. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) – causa diarreia aquosa e disenteria; VI. *E. coli* uropatogênica (UPEC) – principal agente de infecções do trato urinário (ITUs) em humanos e animais; VII. meningite neonatal *E. coli* (NMEC) – associada a meningite e sepse em recém-nascidos (Palaniappan et al., 2006). Cada patótipo reúne uma

combinação particular de fatores de virulência que favorece uma patogênese específica, direcionada a um nicho definido dentro do hospedeiro (Kaper; Nataro; Mobley, 2004).

Entre esses patótipos, *E. coli* uropatogênica (UPEC) é responsável por pelo menos 80% das ITUs adquiridas na comunidade (Lee; Lee; Choe, 2018). UPEC se diferencia das *cepas* comensais de *E. coli* pela sua capacidade de expressar um repertório ampliado de fatores de virulência, como flagelos, polissacarídeo capsular (CPS), proteínas da membrana externa, diferentes fímbrias (como *pili* tipo 1 e *pili* P), toxinas, sistemas de aquisição de ferro e produção de biofilme (Mancuso et al., 2023; Shah et al., 2019). Em conjunto, esses mecanismos favorecem a migração da bactéria do intestino para o trato urinário após contaminação fecal da região periuretral, permitindo sua adesão e invasão das células uroteliais, garantindo assim a colonização e a persistência no trato urinário (Shah et al., 2019).

K. pneumoniae, embora menos prevalente que UPEC, tem ganhado destaque como importante uropatógeno, sobretudo em infecções nosocomiais e em ITUs complicadas (Schroll et al., 2010). Trata-se de uma bactéria oportunista, Gram-negativa, que pode integrar a microbiota normal, sendo comumente encontrada no trato gastrointestinal humano (Ring et al., 2023). Ainda que possa estar presente como componente comensal em indivíduos saudáveis, *K. pneumoniae* tem o potencial para se tornar patogênica e causar infecções graves, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos, estando associada a infecções respiratórias, bacteremia e, principalmente, infecções do trato urinário, sendo este último o local mais comum de infecção (Podschun; Ullmann, 1998). Em um estudo realizado nos Estados Unidos, que avaliou 270.552 isolados urinários positivos para *Klebsiella* spp., 250.719 foram identificados como *K. pneumoniae*, evidenciando sua participação expressiva em casos de ITU (Kaye et al., 2024). De forma semelhante, estudo conduzido em Bagdá, no Iraque, relatou prevalência de 80% de *K. pneumoniae* entre pacientes com ITU, com maior predominância em indivíduos acima de 60 anos (Abdalhadi, 2024).

Assim como UPEC, *K. pneumoniae* utiliza-se de fímbrias para aderência ao urotélio, formação de biofilmes e colonização da bexiga (Schroll et al., 2010). Além disso, sua patogenicidade é atribuída a um conjunto de fatores de virulência que inclui polissacarídeo capsular (CPS), lipopolissacarídeo (LPS), adesinas e sistemas de

aquisição de ferro (Ochońska; Brzychczy-Włoch, 2024). Como consequência, essa espécie desempenha um papel relevante no desenvolvimento de infecções nosocomiais, em particular pela capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos, especialmente cateteres urinários (Schroll et al., 2010).

Ainda pouco conhecida em relação a outros uropatógenos, a espécie *K. variicola* tem sido cada vez mais encontrada em ambientes clínicos, incluindo como causa de ITUs. Inicialmente descrita como parte dos microbiomas vegetais, essa espécie se tornou um patógeno humano emergente, com características genéticas e fenotípicas muito semelhantes às de *K. pneumoniae*, o que muitas vezes dificulta sua identificação correta (Nucci et al., 2023). Os fatores de virulência que contribuem para as ITUs incluem a cápsula, um fator de virulência clássico em espécies de *Klebsiella*, além de fimbrias, produção de sideróforos e a presença de genes de resistência, como β -lactamases e bombas de efluxo (Potter et al., 2018).

S. saprophyticus é outro agente etiológico de destaque no contexto das ITUs. Trata-se de uma bactéria Gram-positiva, coagulase-negativa, que pode integrar o microbioma humano, mas que está frequentemente associado a ITUs não complicadas, sobretudo episódios de cistite em mulheres jovens sexualmente ativas (Mancuso et al., 2023; Raz; Colodner; Kunin, 2005). Essa espécie é responsável por até 40% das infecções urinárias em mulheres jovens, configurando-se como a segunda causa mais comum de ITU comunitária nesse grupo etário, após *E. coli* (Mancuso et al., 2023; Raz; Colodner; Kunin, 2005). Os principais fatores de virulência descritos para *S. saprophyticus* incluem proteínas de superfície com função adesina, como Aas (Autolysin Adhesion Surface Protein), UafA/UafB (Urothelium-Adhesive Factors A and B) e Sdrl (Serine-Aspartate Repeat Protein I). Aas se liga à fibronectina e ao urotélio de ureteres; UafA e UafB mediam a adesão ao epitélio vesical e a componentes da matriz extracelular; Sdrl interage com colágeno, favorecendo a colonização do trato urinário (Govindarajan; Kandaswamy, 2022; Kline; Lewis, 2016; Mancuso et al., 2023). Além disso, a produção de urease é uma característica marcante desse microrganismo, promovendo a hidrólise da ureia e o aumento do pH urinário. Essa alcalinização favorece a precipitação de sais e a formação de cálculos urinários, contribuindo para a persistência deste microrganismo na bexiga e nos rins (Gattermann; John; Marre, 1989; Mancuso et al., 2023).

Entre os uropatógenos frequentemente isolados em culturas de urina, destaca-se também *P. mirabilis*, amplamente reconhecido como causador de ITUs adquiridas na comunidade e importante agente etiológico de ITUs nosocomiais, em especial das infecções do trato urinário associadas a cateter (ITUAC) (Armbruster; Mobley, 2012; Danilo de Oliveira et al., 2021). Trata-se de uma bactéria Gram-negativa cuja patogenicidade está relacionada a um repertório amplo de fatores de virulência, incluindo a formação de biofilme, múltiplos tipos de fímbrias que favorecem a adesão às células uroteliais e a colonização da bexiga e dos rins, além de sistemas de aquisição de ferro (Armbruster; Mobley, 2012; Danilo de Oliveira et al., 2021) (Mancuso et al., 2023). Em estudo brasileiro com isolados de ITU adquirida na comunidade, todos os isolados de *P. mirabilis* apresentaram genes associados à produção de hemolisina (hpmA), aglutinina tóxica de *Proteus* (pta), protease ZapA, diversas fímbrias (mrpA, pmfA, ucaA, atfA) e ao sistema de captação de ferro IreA, bem como elevada capacidade de formar biofilmes (Danilo de Oliveira et al., 2021). Além disso, *P. mirabilis* produz urease em altos níveis, promovendo a hidrólise da ureia e a alcalinização da urina, o que favorece a precipitação de cristais e a formação de cálculos, bem como a incrustação e obstrução de cateteres urinários (Armbruster; Mobley, 2012; Mobley; Belas, 1995). Em conjunto com a motilidade flagelar em “swarming”, fenômeno em que células curtas se diferenciam em formas alongadas e hiperflageladas que se organizam em enxames multicelulares, promovendo motilidade coordenada sobre superfícies sólidas (Armbruster; Mobley, 2012; Mobley; Belas, 1995), esses fatores contribuem para a ascensão bacteriana ao trato urinário superior e para a persistência da infecção (Armbruster; Mobley, 2012; Mancuso et al., 2023).

A importância clínica desses microrganismos não se limita à sua capacidade de promover a infecção. Além de apresentarem um amplo repertório de fatores de virulência, as bactérias uropatogênicas têm exibido níveis crescentes de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento das ITUs, inserindo-se em um cenário de resistência antimicrobiana e sendo reconhecidas como importante ameaça à saúde global (Costelloe et al., 2010; Li et al., 2022). Em nível individual, o uso de antibióticos na atenção primária para infecções respiratórias ou urinárias associa-se ao aumento da probabilidade de seleção de bactérias resistentes, efeito que é mais intenso no primeiro mês após o tratamento, podendo persistir por até 12 meses, contribuindo

para a disseminação comunitária de *cepas* resistentes (Costelloe et al., 2010). A redução da eficácia dos esquemas empíricos resulta em maior risco de falha terapêutica, necessidade de internação e aumento de morbidade e mortalidade, especialmente em grupos vulneráveis, como idosos, gestantes, crianças pequenas, pacientes imunocomprometidos, indivíduos com doenças crônicas e pacientes hospitalizados ou expostos a dispositivos invasivos, como cateteres urinários (Storme et al., 2019).

De acordo com estimativas globais de Li et al. (2022), baseadas no Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019), as ITUs associadas à resistência antimicrobiana foram responsáveis, em 2019, por aproximadamente 64,89 mil mortes atribuídas diretamente à resistência. *E. coli* e *K. pneumoniae* responderam juntas por mais de 50% dessas mortes, com elevadas taxas de resistência a fluoroquinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração (Li et al., 2022). No Brasil, Galvão et al. (2023) avaliaram isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes de ITUs de origem comunitária e observaram que 46,2% das *cepas* de *E. coli* eram resistentes à ampicilina, 9,4% à cefalexina e 6,5% à cefuroxima, enquanto *K. pneumoniae* apresentou resistência de 23,7% à nitrofurantoína e 18,6% à cefuroxima. Para ambas as espécies, cerca de 26% dos isolados foram resistentes às fluoroquinolonas e ao sulfametoxazol-trimetoprim, e 14,7% das *cepas* de *E. coli* e 24,7% de *K. pneumoniae* foram classificadas como multirresistentes (MDR) (Galvão et al., 2023). Um microrganismo é considerado multirresistente quando apresenta não suscetibilidade a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais categorias distintas de agentes (Magiorakos et al., 2012), o que ilustra a gravidade do perfil de resistência observado em uropatógenos clínicos.

Diante dessa situação, em 2024 a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou a *WHO Bacterial Priority Pathogens List* (BPPL), inicialmente publicada em 2017, identificando 24 combinações patógeno–droga que representam as maiores ameaças à saúde pública em razão da resistência aos antibióticos. Essas combinações são estratificadas em três níveis de prioridade (crítica, alta e média), com base em critérios como mortalidade, carga de doença, tendência de resistência, transmissibilidade e disponibilidade de opções terapêuticas (World Health Organization (WHO), 2024). Além disso, a OMS classifica essas combinações resistentes de acordo com a

letalidade associada às infecções que causam. Conforme apresentado na Figura 3, *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (CR) situa-se na categoria de alta letalidade (>30%), enquanto *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de terceira geração (3GCR) e *E. coli* resistente a fluoroquinolonas (FQR) se inserem na faixa de letalidade médio-alta (21–30%). Já *E. coli* e *Proteus* spp. resistentes a cefalosporinas de terceira geração (3GCR) encontram-se na categoria de letalidade média (11–20%) (World Health Organization (WHO), 2024).

Baixo (< 5%)	Baixo-médio (5–10%)	Médio (11–20%)	Médio-alto (21–30%)	Alto (> 30%)
FQR <i>Salmonella</i> não tifoide	FQR <i>Shigella</i> spp.	3GCR <i>E. coli</i>	FQR <i>E. coli</i>	CR <i>K. pneumoniae</i>
FQR <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3GCR <i>Morganella</i> spp.	FQR <i>Salmonella Typhi</i>	3GCR <i>K. pneumoniae</i>	CR <i>A. baumannii</i>
3GCR <i>N. gonorrhoeae</i>	Pen-R <i>Estreptococos</i> do grupo B	3GCR <i>Enterobacter</i> spp.	VR <i>E. faecium</i>	CR <i>P. aeruginosa</i>
Macro-R <i>Estreptococos</i> do grupo A		3GCR <i>Citrobacter</i> spp.	MR <i>S. aureus</i>	CR <i>Enterobacter</i> spp.
		3GCR <i>Proteus</i> spp.		
		3GCR <i>Serratia</i> spp.		
		Macro-R <i>S. pneumoniae</i>		
		Ampi-R <i>H. influenzae</i>		

Figura 3 - Patógenos resistentes classificados por nível de letalidade. FQR, resistente a fluoroquinolonas; 3GCR, resistente a cefalosporinas de terceira geração; CR, resistente a carbapenêmicos; Pen-R, resistente à penicilina; VR, resistente à vancomicina; Macro-R, resistente a macrolídeos; Ampi-R *H. influenzae*, *Haemophilus influenzae* resistente à ampicilina.

Fonte: Adaptado de World Health Organization (WHO), 2024.

O cenário torna-se ainda mais preocupante porque, na maioria dos casos de ITU, sejam elas adquiridas na comunidade ou em ambiente hospitalar, a terapia antimicrobiana é iniciada de forma empírica, antes da disponibilidade dos resultados da urocultura, que podem demorar até 48 horas (Farrell et al., 2003; Ghosheh et al., 2023). Nessas circunstâncias, a decisão terapêutica inicial baseia-se frequentemente apenas em manifestações clínicas, o que pode levar ao uso desnecessário de antibióticos em quadros não infecciosos ou de etiologia não bacteriana, e ao atraso na instituição de uma terapia adequada em pacientes com infecção já estabelecida, sobretudo em populações vulneráveis e em contexto de terapia intensiva (Peri et al., 2021). Estudos recentes mostram que métodos diagnósticos rápidos, incluindo

plataformas moleculares como a multiplex PCR, são capazes de identificar, em poucas horas, patógenos bacterianos e fúngicos em diferentes amostras clínicas, permitindo ajuste precoce e mais direcionado da terapia antimicrobiana, com impacto positivo em desfechos clínicos (Peri et al., 2021; Serapide et al., 2025). Nesse contexto, ainda que não substituam a urocultura e os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, tornam-se particularmente relevantes abordagens diagnósticas rápidas, capazes de indicar precocemente a presença de ITU e de discriminar se a provável etiologia é bacteriana ou fúngica, apoiando a tomada de decisão clínica em tempo oportuno em pacientes criticamente enfermos ou sob maior risco de complicações. Esses aspectos reforçam a necessidade de aprimoramento dos métodos diagnósticos das ITUs, tema abordado no subtópico a seguir.

1.3 Diagnóstico em ITUs

Apesar da alta incidência, o diagnóstico das infecções relacionadas ao trato urinário ainda é baseado principalmente nos sintomas clínicos e exames laboratoriais tradicionais, que incluem análise de fita reagente, análise microscópica de urina e cultura (Sujith; Solomon; Rayappan, 2024). Entretanto, esses métodos tradicionais, embora amplamente utilizados, costumam ser demorados e trabalhosos. Por esse motivo, os profissionais de saúde frequentemente iniciam a prescrição de antibióticos de forma empírica, antes da confirmação diagnóstica, o que contribui para o aumento da resistência antimicrobiana (Farrell et al., 2003; Ramaiah et al., 2025). Em razão disso, novos métodos diagnósticos, como técnicas moleculares (PCR, sequenciamento) e imunológicas (ensaios imunocromatográfico, biossensores), estão sendo desenvolvidas para otimizar o tempo e a precisão do diagnóstico de ITU, a fim de superar as limitações dos métodos atuais (Ramaiah et al., 2025; Sujith; Solomon; Rayappan, 2024).

O exame diagnóstico padrão para ITUs se inicia com a avaliação dos sintomas, que comumente incluem dor ao urinar (disúria), aumento da frequência de micção e urgência (Davenport et al., 2017), desconforto ou dor na parte inferior do abdômen e alterações na aparência da urina, como turvação ou odor forte (Marshall; Hale, 2017).

A partir das queixas clínicas, os médicos solicitam a análise de urina como um teste de triagem, que avalia parâmetros físicos, químicos e microscópicos (Mambatta et al., 2015), onde a urinálise por fita reagente é a primeira etapa no teste de urina, que permite verificar a presença de nitritos e esterase leucocitária, detectando bacteriúria e piúria, respectivamente (Davenport et al., 2017), além de verificar também a presença de hemácias.

A grande desvantagem do uso das fitas reagentes está relacionada à possibilidade de resultados falso-negativos, especialmente na presença de patógenos não produtores de nitrito, como *Enterococcus* e *Staphylococcus* spp. (Devillé et al., 2004). Aliás, a interpretação da fita reagente pode ser influenciada por vários fatores, incluindo diferentes condições de luz e percepção individual das cores, o que pode levar a leituras ambíguas, afetando a precisão dos resultados (Tohl et al., 2024). Em uma meta-análise que incluiu 58 estudos, o teste de fita reagente para nitrito demonstrou um desempenho limitado, com baixa sensibilidade (45-60%), embora tenha apresentado uma elevada especificidade (85-98%) (Devillé et al., 2004). Adicionalmente, utiliza-se a análise microscópica para verificação, onde o sedimento urinário obtido por centrifugação é analisado quanto à presença de glóbulos brancos (leucócitos) e bactérias (Mambatta et al., 2015).

Um outro método diagnóstico tradicional é a cultura de urina ou urocultura, ainda considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de ITU (Sun; Cheng; Xie, 2024). A urina é cultivada em placas de ágar para crescimento, isolamento e identificação do microrganismo, onde amostras com contagens $\geq 10^5$ UFC/mL de uma única ou predominante espécie de bactéria, são consideradas culturas positivas (Kass, 1957). No entanto, esta técnica é demorada e requer de 24 a 48 horas para obter resultados (Ghosheh et al., 2023). Concluído o isolamento e identificação do patógeno, o teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), um ensaio fenotípico que avalia o crescimento do microrganismo na presença de antimicrobianos específicos, pode levar de 24 a 48 horas adicionais para a obtenção dos resultados de susceptibilidade (Davenport et al., 2017).

1.3.1 Populações vulneráveis e novas abordagens diagnósticas nas ITUs

Além das limitações técnicas e temporais dos métodos convencionais, certos grupos de pacientes enfrentam desafios adicionais no diagnóstico de ITUs. Idosos, recém-nascidos e imunocomprometidos, por exemplo, podem apresentar manifestações clínicas atípicas, dificuldade na coleta adequada de urina ou mesmo incapacidade de relatar sintomas com precisão (Kuil et al., 2020; Zorc; Kiddoo; Shaw, 2005).

De forma semelhante, situações clínicas que exigem decisões rápidas, como em pacientes pré-operatórios ou internados em unidades de terapia intensiva, demandam métodos que aliem rapidez, sensibilidade e aplicabilidade prática (Peri et al., 2021). Nesses contextos, testes capazes de indicar de forma ágil a presença de infecção urinária têm o potencial de reduzir atrasos em procedimentos, orientar precocemente a conduta clínica e contribuir para melhor prognóstico, especialmente em populações vulneráveis (Kuil et al., 2020; Llor et al., 2024). Um estudo em instituição de longa permanência, por exemplo, mostra que critérios diagnósticos convencionais apresentam desempenho limitado em idosos, o que compromete a detecção precoce da ITU (Llor et al., 2024).

Nesse cenário, métodos avançados vêm sendo avaliados para facilitar o diagnóstico de ITU, um exemplo é a Citometria de Fluxo usada como uma ferramenta eficaz na triagem de amostras negativas de urina, onde pesquisadores demonstraram um alto valor preditivo negativo (NPV) de até 99,7%, evitando uroculturas desnecessárias (Cho; Hur, 2018). Outro estudo relatou redução de aproximadamente 37% no volume de uroculturas ao usar essa tecnologia na rotina laboratorial (Korsten et al., 2024). Apesar de suas vantagens, ainda não há consenso quanto aos valores de corte ideais para detecção de bactérias, o que pode levar a resultados inconsistentes em diferentes estudos e ambientes clínicos. Além disso, o custo elevado dos equipamentos, aliado às despesas com manutenção e reagentes específicos, torna o método pouco acessível para pequenos e médios laboratórios clínicos (Martín-Gutiérrez et al., 2022).

O uso de ferramentas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de nova geração (NGS), avançou substancialmente nos últimos anos, consolidando seu papel emergente na identificação e no diagnóstico das

ITUs (Zhao et al., 2024). Em meta-análise recente, Zhao et al. (2024) relataram que a PCR apresenta sensibilidade de 99% e especificidade de 94% para o diagnóstico de ITU, enquanto o NGS atinge sensibilidade de 90% e especificidade de 86%, quando comparados à urocultura convencional. Esses métodos baseiam-se na detecção e amplificação de segmentos específicos de DNA presentes na urina, permitindo identificar rapidamente o patógeno, inferir opções terapêuticas mais adequadas e, em alguns painéis, avaliar genes de resistência antimicrobiana (Zhao et al., 2024). A PCR pode ser empregada de forma qualitativa, para confirmar a presença de um microrganismo, ou quantitativa, para estimar sua carga bacteriana (Hinata et al., 2004; Zhao et al., 2024). Já o NGS oferece uma análise abrangente do microbioma urinário ao sequenciar praticamente todo o DNA microbiano presente na amostra e compará-lo a bancos de dados de espécies, superando a limitação da PCR, que detecta um número limitado de microrganismos (Huang et al., 2023; Zhao et al., 2024). Todavia, esses métodos ainda apresentam algumas limitações, como o alto custo e a necessidade de equipamentos e conhecimentos especializados, se tornando técnicas restritas a poucos ambientes de saúde e centros de pesquisa (Zhao et al., 2024).

Entre as técnicas igualmente exploradas para diagnóstico, destaca-se a espectrometria de massas (MS), em especial analisadores do tipo MALDI-TOF MS, que têm sido incorporados à prática clínica para identificação rápida de microrganismos com base no perfil proteico obtido diretamente das amostras, incluindo a urina, reduzindo significativamente o tempo necessário para o diagnóstico em comparação com os métodos tradicionais de cultura (Neuenschwander; Groß; Schubert, 2023). No entanto, para uma identificação precisa é necessária uma carga bacteriana suficiente presente na amostra, o que pode ser uma limitação nos casos em que a contagem de bactérias ainda é baixa, bem como pode apresentar desafios na identificação de amostras com infecções mistas (Haider et al., 2023). Outro aspecto relevante é que, apesar de seu elevado desempenho e rapidez, a infraestrutura necessária e os custos substanciais de aquisição e operação do MALDI-TOF MS dificultam sua incorporação em laboratórios clínicos de menor porte, o que restringe o seu uso principalmente em instituições de referência (Haider et al., 2023). Estima-se um investimento inicial em torno de US\$ 270.000 para aquisição do equipamento, além de contratos anuais de manutenção entre US\$ 25.000 e US\$ 30.000, valores

que tornam essa tecnologia inviável para a maioria dos pequenos e médios laboratórios (Tran et al., 2015).

Apesar desses avanços, a maior parte das tecnologias moleculares e de espectrometria de massas permanece restrita a centros de referência e a contextos de pesquisa, enquanto os métodos tradicionais seguem predominando na rotina da microbiologia clínica (Bermudez et al., 2025). A adoção efetiva de novas tecnologias depende não apenas de infraestrutura, mas também da adaptação a novos conceitos diagnósticos e do treinamento adequado das equipes para sua correta interpretação (Bermudez et al., 2025).

Sob essa ótica, novos estudos propõem metodologias inovadoras que visam melhorar simultaneamente a precisão diagnóstica, a velocidade de obtenção dos resultados e a racionalização da terapia antimicrobiana. Algumas das propostas emergentes incluem plataformas baseadas em biossensores e microfluídica, integradas ou não a sistemas de TSA (Davenport et al., 2017). Boa parte dessas inovações são direcionadas a reduzir o tempo de diagnóstico, desenvolvendo testes mais rápidos, potencialmente acessíveis e adequados para locais remotos, permitindo o diagnóstico de ITU no ponto de atendimento (point-of-care, POC) (Sujith; Solomon; Rayappan, 2024). A aplicação de biossensores é um exemplo de dispositivo POC, atuando como ferramenta analítica miniaturizada de diagnóstico rápido, com alta sensibilidade e seletividade, que pode ser utilizada à beira-leito ou fora de ambientes laboratoriais convencionais (Yang et al., 2024).

Um biossensor é composto, em termos gerais, por um elemento de reconhecimento biológico (como anticorpos, ácidos nucleicos, células ou bactérias) acoplado a um transdutor de sinal, que converte a interação entre o analito e o elemento de reconhecimento em um sinal mensurável, detectado por técnicas ópticas, eletroquímicas ou de condutância (Davenport et al., 2017). Inclusive, smartphones podem ser acoplados a essas plataformas, funcionando como unidades portáteis de leitura e processamento de dados, o que contribui para reduzir custo, tempo e infraestrutura necessários para o diagnóstico em POC (Davenport et al., 2017; Kadlec et al., 2014).

Além dos biossensores, dispositivos microfluídicos têm se destacado como outra plataforma emergente para o diagnóstico rápido de ITUs. Nesses sistemas,

pequenas populações de bactérias, e até mesmo células isoladas, podem ser confinadas em câmaras ou canais com volumes na faixa de picolitros a nanolitros, permitindo que o crescimento celular seja monitorado por técnicas como microscopia e fluorescência (Davenport et al., 2017). O cultivo de células em volumes tão reduzidos favorece o acúmulo rápido de metabólitos e acelera a detecção do crescimento microbiano em comparação às técnicas de cultura tradicionais (Davenport et al., 2017). Ademais, as plataformas microfluídicas podem atuar como dispositivos independentes ou serem acopladas a métodos de detecção óptica e a ensaios baseados em biossensores, reduzindo o consumo de reagentes, miniaturizando o sistema de detecção e diminuindo o tempo necessário para diagnóstico (Sin et al., 2013; Yang et al., 2024).

Complementando os avanços tecnológicos aplicados ao diagnóstico de ITUs, estratégias imunodiagnósticas também têm ganhado destaque. Dentre elas, destacam-se as abordagens baseadas em determinantes antigênicos (epítomos), regiões específicas de um antígeno capazes de desencadear respostas imunes mediadas por células B ou T (Parvizpour et al., 2020). Do ponto de vista estrutural, epítomos de células B podem ser classificados como lineares (ou contínuos), quando formados por segmentos contíguos de aminoácidos, ou conformacionais (ou descontínuos), quando resultam da aproximação espacial de resíduos distantes na sequência primária, mas próximos na estrutura tridimensional da proteína (Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017). Embora a maioria dos epítomos de células B seja conformacional, epítomos lineares são amplamente explorados em ensaios imunodiagnósticos por serem mais facilmente sintetizados e incorporados em testes diagnósticos e formulações vacinais (Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017; Sun et al., 2019).

A seleção e predição de epítomos conservados tem permitido o desenvolvimento de anticorpos altamente específicos, aplicáveis em ensaios diagnósticos de maior sensibilidade e acurácia (Zhou et al., 2022). Nesse contexto, ferramentas de imunoinformática vêm sendo empregadas na identificação *in silico* de epítomos de células B com potencial diagnóstico, possibilitando a seleção apenas dos fragmentos mais específicos de um antígeno, para o desenvolvimento de anticorpos direcionados (Bottino et al., 2013; Sun et al., 2019). Tal estratégia tende a aumentar a

especificidade dos ensaios imunodiagnósticos, reduzir o risco de reações cruzadas e melhorar a sensibilidade dos testes (Sun et al., 2019).

Alguns estudos têm demonstrado o potencial dessas estratégias. Klimka et al. (2021) caracterizaram dois candidatos vacinais de *S. aureus*, CgoX (coproporfirinogênio oxidase) e TPI (triose-fosfato isomerase), e geraram anticorpos monoclonais (mAbs) epítipo-específicos contra essas proteínas (Klimka et al., 2021). Em particular, um desses mAbs reconheceu um epítipo linear de 12 aminoácidos altamente conservado em isolados clínicos, e tanto os mAbs quanto o epítipo conjugado à albumina sérica bovina (BSA) conferiram proteção em modelo murino de infecção por *S. aureus* (Klimka et al., 2021). Enquanto isso, Stapleton et al. (2015) avaliaram, em 966 amostras de urina humana, a aplicação clínica de um imunoensaio imunocromatográfico de fluxo lateral (RapidBac), previamente aprovado para uso veterinário, com o objetivo de diagnosticar rapidamente a bacteriúria significativa. O teste consistia na aplicação da urina em uma tira contendo dois anticorpos monoclonais: um direcionado exclusivamente para *Enterobacteriaceae* e outro de espectro mais amplo, capaz de reconhecer espécies Gram-negativas e Gram-positivas (Stapleton et al., 2015). O ensaio, apresentou sensibilidade de 86% para amostras com $\geq 10^3$ UFC/ml de bactérias e especificidade de 94% quando comparado à urocultura padrão (a cultura padrão exibiu sensibilidade e especificidade de 100%). Para bactérias Gram-negativas com carga $\geq 10^4$ UFC/ml, a sensibilidade alcançou 96% (Stapleton et al., 2015).

Um outro trabalho recente, conduzido na Argentina, desenvolveu um teste imunocromatográfico rápido (TI) utilizando anticorpo de captura específico para detecção de *E. coli* em amostras de urina. Nesse estudo, o ensaio apresentou sensibilidade de 74,5% e especificidade de 88,9%. Os autores demonstraram ainda que a combinação da imunodeteção com o uso de fitas reagentes aumentou a sensibilidade global do rastreamento de ITUs, sugerindo que essa abordagem integrada pode aprimorar a acurácia diagnóstica (Da Cunda et al., 2024).

Dando continuidade a essas abordagens, Oliveira et al. (2023) caracterizaram, pela primeira vez, o imunoproteoma extracelular de *S. saprophyticus* ATCC 15305, identificando 36 exoantígenos e mapeando, por análises imunoproteômicas e imunoinformáticas, dez epítopos lineares de células B, sendo cinco exclusivos de *S.*

saprophyticus e cinco conservados em outras bactérias causadoras de ITU. Esses alvos apresentam elevado potencial para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos e de estratégias vacinais voltadas para ITUs (Oliveira et al., 2023).

Em conjunto, esses exemplos ilustram como diferentes estratégias, desde métodos moleculares e baseados em espectrometria de massas, como o MALDI-TOF MS, até abordagens imunodiagnósticas baseadas em epítomos, têm sido investigadas para superar as limitações dos métodos tradicionais aplicados ao diagnóstico de ITUs. À luz desse panorama, a Tabela 1 apresenta uma síntese dos principais métodos disponíveis, destacando vantagens, limitações, tempo de execução e aplicabilidade clínica, bem como as propostas diagnósticas mais recentes.

Tabela 1 - Comparativo entre métodos diagnósticos tradicionais e inovadores para ITUs.

Método Diagnóstico	Classificação	Tempo	Vantagens	Limitações	Custo estimado	Aplicação clínica	Referências
Fita Reagente	Tradicional	Minutos	Alta especificidade; resultado rápido; fácil de executar.	Baixa sensibilidade para alguns patógenos; possibilidade de falsos-negativos; leitura subjetiva.	Baixo	Amplamente utilizado.	Davenport et al., 2017; Devillé et al., 2004; Tohl et al., 2024.
Microscopia do sedimento urinário	Tradicional	Minutos – 1h	Visualização direta de leucócitos, hemácias, cilindros e bactérias.	Requer centrífuga e microscópio; necessidade de operador treinado.	Baixo	Amplamente utilizado.	Mambatta et al., 2015.
Urocultura	Tradicional	24 - 48h	Padrão-ouro; isola e identifica o(s) agente(s) bacteriano(s); permite contagem de UFC/mL.	Tempo prolongado; requer infraestrutura de microbiologia.	Moderado	Amplamente utilizado.	Sun; Cheng; Xie, 2024; Kass, 1957; Ghosheh et al., 2023.
TSA (Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana)	Tradicional	≥24–48h após a cultura	Define o perfil de suscetibilidade antimicrobiana; subsidia terapia direcionada.	Depende de cultura prévia; acrescenta tempo até o resultado.	Moderado	Amplamente utilizado.	Davenport et al., 2017.
Citometria de Fluxo	Tecnologia inovadora	Minutos	Alto valor preditivo negativo (VPN ≈	Alto custo; necessidade de padronização de	Alto	Limitado a laboratórios	Cho; Hur, 2018; Korsten et al.,

			99,7%); reduz uroculturas desnecessárias.	pontos de corte (<i>cut-off</i>); equipamento não amplamente disponível.		grande porte e serviços especializados.	2024; Martín-Gutiérrez et al., 2022.
PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	Tecnologia inovadora	Horas - <1 dia	Alta sensibilidade e especificidade (>90%); detecta patógenos de difícil cultivo; identifica genes de resistência.	Custo elevado; requer infraestrutura e equipe especializada.	Alto	Uso limitado em laboratórios clínicos.	Zhao et al., 2024; Hinata et al., 2004.
NGS (Sequenciamento de próxima geração)	Tecnologia inovadora	Dias	Alta sensibilidade e especificidade; avalia o microbioma urinário; detecta múltiplos patógenos e marcadores de resistência em uma única análise.	Protocolo complexo; exige bioinformática e infraestrutura avançada.	Alto	Restrito Centros de pesquisa e laboratórios de referência.	Zhao et al., 2024; Huang et al., 2023.
MALDI-TOF MS	Tecnologia inovadora já estabelecida	Minutos - poucas horas	Rápida identificação de patógenos por perfil proteico; alta precisão na identificação bacteriana.	Exige alta carga bacteriana; equipamento de alto custo; requer infraestrutura especializada.	Muito Alto	Restrito a laboratórios de grande porte, centros de referência e pesquisa.	Neuenschwander; Groß; Schubert, 2023; Haider et al., 2023; Tran et al., 2015.

Biossensores	Tecnologia inovadora/POC	Minutos - poucas horas	Portáteis; resposta rápida; alta sensibilidade; potencial integração com dispositivos móveis (como smartphones).	Em desenvolvimento; ainda não amplamente aprovados para uso clínico rotineiro; necessidade de validação clínica.	Baixo a moderado	Uso emergente e experimental.	Davenport et al., 2017; Yang et al., 2024; Kadlec et al., 2014.
Microfluídica	Tecnologia inovadora/POC	Minutos - poucas horas	Consumo mínimo de amostra e reagentes; detecção rápida; potencial para dispositivos compactos e portáteis.	Técnicas ainda em desenvolvimento; necessidade de padronização e regulamentação específica.	Baixo a moderado	Uso ainda experimental (fase de pesquisa e desenvolvimento).	Davenport et al., 2017; Sin et al., 2013; Yang et al., 2024.
Imunodeteção	Tecnologia inovadora/POC	Minutos - poucas horas	Resultado rápido; possibilidade de uso direto na urina; dispensa etapa de cultura; potencial para testes simples à beira-leito.	Métodos ainda em validação; dependem de anticorpos específicos e bem padronizados; podem não distinguir todas as espécies bacterianas.	Moderado	Uso ainda experimental (fase de pesquisa e desenvolvimento).	Stapleton et al., 2015; Da Cunda et al., 2024; Klimka et al., 2021; Sun et al., 2019; Zhou et al., 2022.

Fonte: Elaboração própria, 2026.

Diante da relevância das ITUs para o sistema de saúde e para os pacientes, o presente estudo insere-se entre as abordagens emergentes para o diagnóstico rápido das infecções urinárias, ao propor o uso de anticorpos policlonais direcionados a epítomos bacterianos como estratégia inovadora para a detecção de uropatógenos. Em continuidade a estudos prévios que mapearam epítomos imunogênicos em exoantígenos de *S. saprophyticus* e desenvolveram anticorpos policlonais específicos contra esses alvos (Oliveira et al., 2023; Silva, 2025), este trabalho passa a avaliar experimentalmente o desempenho desses anticorpos no reconhecimento de diferentes uropatógenos de interesse clínico, bem como sua utilidade na distinção entre infecções bacterianas e fúngicas do trato urinário. Ao explorar o uso de epítomos bacterianos específicos em um ensaio de imunodetecção, esta pesquisa busca gerar evidências para o desenvolvimento de uma alternativa diagnóstica viável e adaptável ao cenário clínico e laboratorial, com potencial aplicação em populações vulneráveis e no contexto atual de crescente resistência antimicrobiana.

2 JUSTIFICATIVA

As infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as infecções mais comuns na prática clínica, acometendo milhões de pessoas de diferentes faixas etárias e gêneros ao longo da vida (Lawati; Blair; Larnard, 2024). Tradicionalmente, uma ITU é definida pela presença de sinais e sintomas clínicos, como disúria, urgência, aumento da frequência urinária, dor pélvica ou abdominal inferior, em combinação com a identificação do patógeno causador por meio de urocultura (Bermudez et al., 2025; Lawati; Blair; Larnard, 2024). No entanto, essa abordagem baseada em sintomas apresenta desempenho limitado em determinados grupos, como crianças muito pequenas, idosos, indivíduos com cateter vesical crônico ou com anormalidades urológicas e neurológicas, nos quais os sinais e sintomas podem ser inespecíficos ou ambíguos (Bermudez et al., 2025). Além disso, o diagnóstico microbiológico ainda se apoia majoritariamente em métodos tradicionais, especialmente urinálise e urocultura, que, embora sejam considerados padrão de referência, apresentam limitações importantes, incluindo o tempo prolongado até o resultado e a baixa sensibilidade para detectar bacteriúria leve e microrganismos fastidiosos, que podem não crescer em meios de cultura convencionais (Bermudez et al., 2025; Claeys et al., 2019). Tendo isso em vista, as ITUs representam uma das principais razões para a prescrição de antibióticos antes da confirmação laboratorial, promovendo, muitas vezes, o uso indiscriminado dessas drogas e, conseqüentemente, propiciando a seleção e disseminação de isolados resistentes (Sujith; Solomon; Rayappan, 2024).

O desenvolvimento de abordagens diagnósticas mais rápidas e precisas é, portanto, imprescindível para otimizar a tomada de decisão clínica, sobretudo em populações vulneráveis. Em crianças pequenas, a coleta adequada de amostras urinárias e a identificação de sintomas específicos ainda representam desafios diagnósticos importantes (Zorc; Kiddoo; Shaw, 2005). De forma semelhante, idosos, pacientes imunocomprometidos e indivíduos candidatos a procedimentos urológicos invasivos requerem estratégias diagnósticas mais sensíveis, operacionalmente simples e aplicáveis à beira-leito (Kuyl et al., 2020). Métodos mais ágeis não apenas reduzem a necessidade de prescrição empírica de antibióticos, como também contribuem para evitar o uso inadequado de antimicrobianos, particularmente em

casos de infecções de etiologia não bacteriana, como as ITUs fúngicas (Davenport et al., 2017). Nesse contexto, técnicas de imunodiagnóstico baseadas em epítomos específicos despontam como alternativa promissora às uroculturas, uma vez que se valem da alta especificidade de anticorpos para reconhecer antígenos definidos, permitindo detecção rápida e potencialmente mais sensível dos patógenos (Zhou et al., 2022).

Portanto, a presente pesquisa, ao utilizar anticorpos policlonais produzidos por Silva (2025), em estudo ainda não publicado, a partir de epítomos previamente mapeados por Oliveira (2023) em exoantígenos de *S. saprophyticus*, com potencial para o reconhecimento de alvos conservados em bactérias uropatogênicas de relevância clínica, configura-se como uma estratégia inovadora para detecção das infecções urinárias. Ao explorar alvos compartilhados por diferentes uropatógenos, esses anticorpos têm potencial para atuar como ferramenta de triagem rápida, capaz de indicar a presença de infecção bacteriana e auxiliar na diferenciação de quadros de outra etiologia, como as ITUs fúngicas. Os resultados deste estudo podem apoiar pesquisas futuras, contribuindo para o desenvolvimento de ensaios imunológicos mais eficazes, que buscam reduzir o tempo de detecção e diagnóstico, a fim de melhorar a conduta clínica e facilitar assim o tratamento oportuno e apropriado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial diagnóstico de anticorpos policlonais, obtidos a partir de epítomos antigênicos identificados em *S. saprophyticus*, na detecção de outras espécies bacterianas uropatogênicas.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar, por meio da técnica de *On-Cell Western*, a capacidade dos anticorpos policlonais anti-epítomos de reconhecer alvos homólogos em células intactas de bactérias uropatogênicas de relevância clínica;
- Avaliar a especificidade do reconhecimento imunológico dos anticorpos para alvos bacterianos, utilizando *Candida albicans* como controle negativo experimental;
- Avaliar o desempenho dos anticorpos em amostras bacterianas cultivadas em urina humana estéril, simulando uma condição experimental mais próxima do ambiente urinário;
- Delimitar experimentalmente a faixa de detecção do anticorpo policlonal AE1 por meio da técnica de *On-Cell Western*.

4 METODOLOGIA

4.1 Isolados Bacterianos

Os isolados bacterianos de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *P. mirabilis*, utilizados ao longo deste trabalho, pertencem à coleção microbiológica do Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (LAMP/IB-UnB). Os microrganismos foram obtidos a partir da urocultura de diferentes pacientes no Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB).

4.2 Cepa de *Candida albicans*

A cepa ATCC5314 de *C. albicans* utilizada nesse trabalho, foi cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (LBMFP/IB-UnB).

4.3 Síntese de epítomos e obtenção de anticorpos policlonais (AE)

A síntese dos epítomos (E) e a obtenção dos anticorpos policlonais (AE) utilizados neste trabalho foram realizadas previamente por Silva (2025), em estudo ainda não publicado.

Os epítomos utilizados foram selecionados a partir de proteínas imunogênicas identificadas no exoproteoma de *S. saprophyticus*. As sequências peptídicas (Tabela 2), com 20 aminoácidos cada, foram sintetizadas quimicamente pela empresa AminoTech Indústria e Comércio Ltda., com 95% de pureza e confirmadas por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) (Silva, 2025).

Tabela 2 - Número de acesso, nome das proteínas e respectivas sequências de epítomos usados no estudo.

Número de acesso à proteína	Proteína	Sequências de epítomos
Q49WH3	Autolisina bifuncional	LYKMRWNPENPGVHQYATDV
Q49ZM2	Antígeno secretor putativo	VENVNSDGSVEVSEMNYNGG
Q49VK7	N-acetilmuramoil-L-alanina amidase	VFNRRAETGQPISTYWWNAD

Fonte: Silva, 2025.

Os anticorpos policlonais (AE) foram obtidos em camundongos fêmeas da linhagem BALB/c da espécie *Mus musculus*, com idade entre 6 e 8 semanas, adquiridos do biotério IPTSP da Universidade Federal de Goiás. Um total de 40 µg de cada epítopo foi utilizado em cada imunização em camundongo BALB/C (3 imunizações com intervalo de 15 dias). Para a primeira inoculação, foi utilizado o Adjuvante Completo de Freund (Sigma Aldrich, Darmstadt, Hesse, Alemanha), nas duas inoculações seguintes foi utilizado o Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma Aldrich, Darmstadt, Hesse, Alemanha), a fim de estimular o sistema imunológico dos camundongos para a produção de anticorpos (Silva, 2025).

Quinze dias após a última inoculação, os camundongos foram submetidos à eutanásia, conforme a Resolução nº 37 do CONCEA, por meio de uma overdose de solução de cetamina e xilazina, em dose anestésica mínima três vezes superior à recomendada. Em seguida, realizou-se a exsanguinação por punção cardíaca, garantindo um volume adequado de soro. Na sequência, os sangues contendo AE foram centrifugados a 5000 g por 5 minutos e os soros armazenados a -20°C, após adição de glicerol 50% (v/v) em proporção 1:1, resultando em concentração final de 25% de glicerol (Silva, 2025).

4.4 Análise *in silico* dos epítomos

As sequências de epítomos (tabela 2) foram obtidas em estudo prévio (Oliveira et al., 2023; Silva, 2025) e correspondem a três proteínas de *S. saprophyticus*: autolisina bifuncional (Q49WH3), antígeno secretor putativo (Q49ZM2) e N-acetilmuramoil-L-alanina amidase (Q49VK7).

A conservação dos epítomos foi avaliada utilizando o servidor BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Ranjbarian et al., 2023). As buscas foram realizadas no banco de dados RefSeq proteins, aplicando filtros taxonômicos específicos para os principais uropatógenos de interesse: *S. saprophyticus* (taxid: 29385), *E. coli* (taxid: 562), *K. pneumoniae* (taxid: 573), *K. variicola* (taxid: 244366) e *P. mirabilis* (taxid: 584). Foram utilizados os parâmetros padrão do BLASTp (NCBI).

Para cada alinhamento, foram registrados o percentual de identidade, a cobertura da sequência (*query cover*) e o *E-value*, a fim de determinar o grau de conservação dos epítomos entre as espécies bacterianas.

Além disso, os alinhamentos foram inspecionados individualmente, e todas as posições divergentes em relação ao epítomo original foram destacadas em vermelho, permitindo visualizar de forma clara quais resíduos diferem da sequência de referência. Esse procedimento serviu de base para a construção das tabelas de alinhamento apresentadas em Resultados e Discussão (Tabelas 3, 4 e 5).

4.5 Detecção de células bacterianas intactas por *On-Cell Western*

Para a detecção das células bacterianas utilizando os anticorpos anti-epítomos, aplicou-se um protocolo fundamentado na técnica *On-cell Western* (OCW), uma variação da técnica *In-cell Western* (ICW), porém com adaptações, a qual permite a

identificação de proteínas de superfície, sem a necessidade de lise celular (Boveia; Schutz-Geschwender, 2015; Brockmüller et al., 2023). No contexto das alterações, os experimentos foram conduzidos em ressuspensão celular em microtubos de centrifugação (tubos Eppendorfs). Além disso, as etapas de fixação e permeabilização celular não foram implementadas no atual protocolo deste trabalho, com o objetivo de manter a célula íntegra para que os anticorpos só reconheçam antígenos expostos na superfície. Ademais, a visualização e detecção dos resultados se deu por intermédio do equipamento L-Pix Chemi (Loccus Biotecnologia), utilizando quimioluminescência (figura 4).

Os ensaios de detecção por *On-Cell Western* foram realizados em triplicata biológica, utilizando isolados clínicos distintos a cada repetição. Para cada uma das quatro espécies bacterianas analisadas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *P. mirabilis*) os ensaios foram repetidos três vezes em dias diferentes, e a cada repetição foram utilizados isolados diferentes da mesma espécie. Em todas as repetições, foram testados os três anticorpos policlonais anti-epítomos (AE1, AE2 e AE3), além de um controle negativo correspondente. Todos os procedimentos foram conduzidos sob as mesmas condições experimentais.

Como Controle Negativo (CN), utilizou-se bactérias, submetidas às mesmas condições experimentais, porém sem a adição do anticorpo anti-epítomo (anticorpo primário).

4.5.1 Cultivo Bacteriano e Preparo das Amostras

As bactérias isoladas foram descongeladas e cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* – BHI (Himedia). Para o pré-inóculo, foram inoculados 50 µL do estoque bacteriano em 10 mL de BHI estéril e incubados a 37 °C por 16–18 horas (Silva, 2025).

Posteriormente, foi realizada a inoculação em Erlenmeyer contendo 50 mL de BHI estéril com 1% do pré-inóculo, as culturas foram incubadas em incubadora à 37 °C, sob agitação, até atingirem densidade óptica (DO) de 0,2 ($\lambda = 620$ nm), correspondente a 5×10^7 células de *E. coli* por mL, estimativa utilizada para as demais espécies bacterianas (Sezonov; Joseleau-Petit; D'Ari, 2007).

Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento bacteriano ressuspenso em 50 mL de

tampão PBS 1X estéril. Esta etapa foi adaptada do protocolo de Silva (2025), onde aplicou-se uma centrifugação mais intensa, sedimentando partículas menores mais rapidamente.

4.5.2 Diluição Seriada da Suspensão Bacteriana

Após a ressuspensão do sedimento bacteriano em tampão PBS 1X estéril, foi realizada uma diluição seriada decimal. A diluição foi realizada em microtubos contendo 900 μL de PBS 1X, identificados de acordo com o fator de diluição (de $1:10^1$ a $1:10^5$) e o controle negativo (CN).

Na sequência, foram transferidos 100 μL da suspensão bacteriana original para o primeiro tubo ($1:10^1$), homogeneizando com agitação leve. Dessa suspensão, foram retirados 100 μL e transferidos para o segundo tubo ($1:10^2$), repetindo o processo sucessivamente até a diluição $1:10^5$. A adaptação das diluições seriadas do protocolo de Silva (2025) permitiu maior agilidade e redução no consumo de reagentes e materiais, sem comprometer a faixa dinâmica de detecção.

4.5.3 Bloqueio das Amostras

Feito a diluição, os microtubos foram centrifugados a $3000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 50 μL de tampão de bloqueio composto por 1% de albumina sérica bovina (Sigma Aldrich) e 0,1% de Tween 20 (Promega) em PBS 1X (Silva, 2025).

As amostras e o CN foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente, sem agitação (Silva, 2025).

4.5.4 Lavagem das Amostras

Após incubação com tampão de bloqueio, os tubos foram centrifugados a $3000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras e o CN foram lavados três vezes com 200 μL de tampão de lavagem (PBS 1X + 0,01% Tween 20). A cada lavagem, os tubos foram centrifugados a $3000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , e o sobrenadante foi cuidadosamente removido, preservando o sedimento bacteriano (Silva, 2025).

4.5.5 Incubação com o Anticorpo Anti-Epítipo (Anticorpo Primário)

Nesta etapa, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 200 µL de anticorpo anti-epítipo, previamente diluído na proporção de 1:2000 em tampão de bloqueio. O CN não recebeu anticorpo primário (Silva, 2025).

As amostras foram incubadas *overnight* 16-18 horas a 4°C, sob agitação leve. Durante os testes iniciais, a incubação com os anticorpos primários ocorreu por 1 hora, conforme protocolo original de Silva (2025), no entanto o sinal de quimioluminescência revelou-se muito fraco. Por isso, optou-se por estender a incubação para *overnight*.

4.5.6 Lavagem Após Incubação com Anticorpo Primário

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, os precipitados foram lavados uma vez com 200 µL de tampão de lavagem. Após a adição do tampão, realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições, e o sobrenadante foi novamente descartado (Silva, 2025).

4.5.7 Incubação com Anticorpo Secundário

O sedimento bacteriano e o CN foram ressuspenso em 800 µL de anti-IgG de camundongo do Kit de detecção de Western Blotting Amersham ECL (Cytiva, código RPN2108), previamente diluído na proporção de 1:4000 em tampão de bloqueio (Silva, 2025).

As amostras e CN foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente, sem agitação (Silva, 2025).

4.5.8 Lavagem Após Incubação com Anticorpo Secundário

Na sequência, os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, os precipitados foram lavados uma vez com 200 µL de tampão de lavagem. Após a adição do tampão, realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições, e o sobrenadante foi novamente descartado (Silva, 2025).

4.5.9 Detecção

O sedimento bacteriano e o CN foram ressuspensos em 50 μ L de solução de substrato de peroxidase, pertencente ao Kit de detecção de Western Blotting Amersham ECL (Cytiva, código RPN2108). Logo após, todo o volume foi transferido para uma placa de 96 poços para a detecção, onde a leitura foi realizada em equipamento L-Pix Chemi (Loccus Biotecnologia), com detecção em modo quimioluminescente com exposição de 20 minutos.

Nesta etapa de detecção, substituindo o aparelho Amersham Imager 600 utilizado por Silva (2025), empregou-se o equipamento L-Pix Chemi, uma vez que o Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da UnB não dispõe do aparelho da Amersham. Apesar disso, o L-Pix Chemi apresentou excelente sensibilidade na detecção de quimioluminescência.

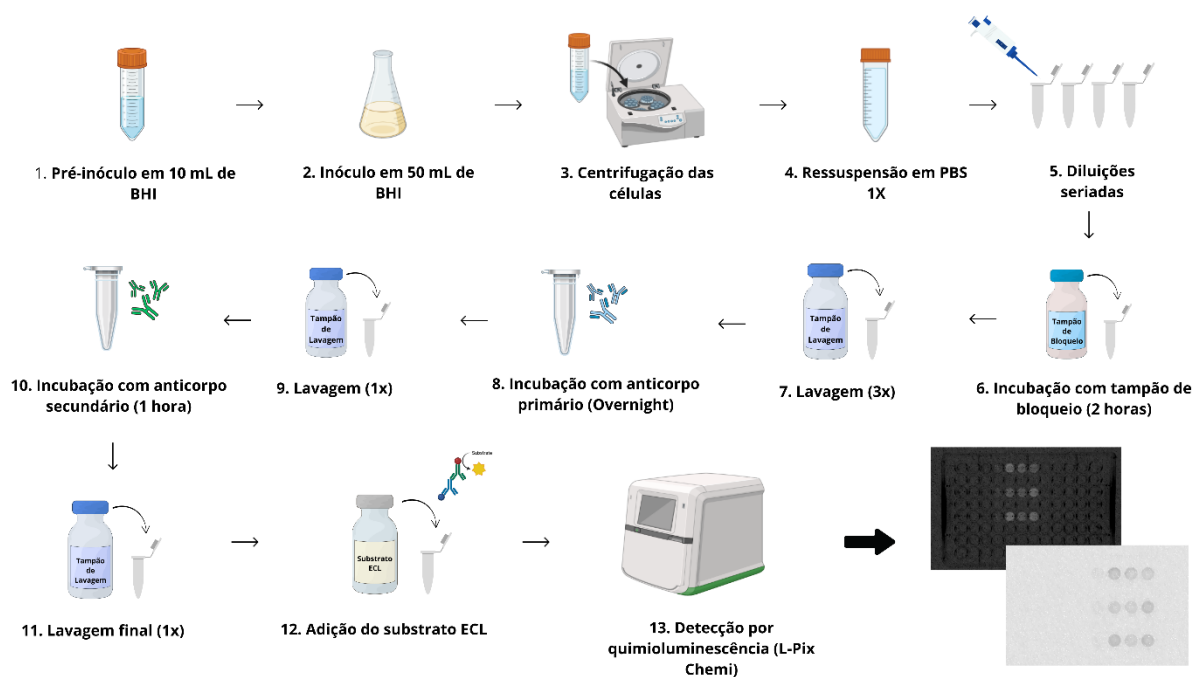


Figura 4 - Representação esquemática da metodologia *On-Cell Western*. As etapas incluem diluições seriadas, bloqueio com BSA 1%, lavagens com PBS-Tween 20, incubação com anticorpos primários e secundário, adição do substrato ECL e detecção por quimioluminescência.

Fonte: Elaboração própria, 2026.

4.6 Análise densitométrica semiquantitativa das imagens de *On-Cell Western*

As imagens de quimioluminescência obtidas no ensaio de *On-Cell Western* foram analisadas de forma semiquantitativa no software ImageJ/Fiji. Inicialmente, as imagens foram convertidas para escala de cinza de 8 bits (Image > Type), invertidas (Edit > Invert) e analisadas apenas quando adquiridas e processadas sob as mesmas condições. Em seguida, foram delimitadas regiões de interesse (ROIs) circulares e padronizadas sobre cada poço utilizando a ferramenta de seleção oval, e a intensidade do sinal foi obtida pelo parâmetro *mean gray value* (Analyze > Measure), correspondente à média da intensidade dos pixels em cada seleção, conforme abordagens de quantificação por imagem descritas para o ImageJ/Fiji (Shihan et al., 2021).

Para reduzir a interferência de sinal basal ou inespecífico, os valores obtidos para cada diluição foram inicialmente corrigidos por subtração do controle negativo (CN) da mesma placa, segundo a equação:

$$\text{mean gray corrigido} = \text{mean gray da diluição} - \text{mean gray do controle negativo}$$

Em que o *mean gray* corrigido corresponde à intensidade da amostra após correção do sinal basal, o *mean gray* da diluição corresponde ao valor obtido para cada diluição analisada, e o *mean gray* do controle negativo corresponde ao valor obtido para o CN da mesma placa. A correção do *background* é uma etapa recomendada em análises densitométricas baseadas em imagem, por melhorar a comparabilidade entre as amostras (Janes, 2015; Taylor et al., 2013; Taylor; Posch, 2014).

Após essa etapa, os dados foram normalizados intra-réplica biológica, adotando-se como referência o maior valor densitométrico observado em cada curva experimental, definido como 100%, enquanto os demais pontos foram expressos como intensidade relativa (%), segundo a equação:

$$\text{Intensidade relativa (\%)} = \frac{\text{mean gray corrigido da diluição}}{\text{maior mean gray corrigido da respectiva réplica biológica}} \times 100$$

Estratégias semelhantes de normalização relativa, com definição do maior valor densitométrico como referência, têm sido empregadas em análises baseadas em imagem utilizando o ImageJ/Fiji (Farooq et al., 2022; Peng et al., 2009). Os valores corrigidos e normalizados foram organizados em planilha eletrônica (Excel), constituindo a base para as análises subsequentes. Os gráficos foram elaborados no software GraphPad Prism.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos após a análise densitométrica e normalização foram organizados em planilhas e submetidos inicialmente à estatística descritiva. Em seguida, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk (Ghasemi; Zahediasl, 2012). Como não foi observado desvio significativo da normalidade, utilizou-se análise de variância de uma via (one-way ANOVA), adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Kim, 2014). As análises foram realizadas no GraphPad Prism.

4.8 Avaliação da faixa de detecção do anticorpo AE1 por *On-Cell Western*

A titulação do anticorpo AE1 para avaliação da faixa de detecção por *On-Cell Western* foi realizada utilizando-se a cepa *E. coli* 104, em triplicata técnica. As culturas bacterianas foram diretamente submetidas ao ensaio, seguindo-se o protocolo descrito no item 4.5, com a utilização de diferentes diluições do anticorpo primário AE1, abrangendo a faixa de 1:2.000 a 1:64.000. Após as etapas de incubação com o anticorpo secundário conjugado e revelação por quimioluminescência, as imagens foram adquiridas com tempos de exposição entre 10 segundos e 3 minutos, ajustados conforme a intensidade do sinal emitido em cada condição experimental.

4.9 Detecção direta de bactérias cultivadas em urina por *On-Cell Western*

O uso das amostras de urina humana esteve vinculado ao projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico molecular e imunológico para infecções urinárias, utilizando LAMP-PCR e anticorpos anti-epítomos bacterianos conservados”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG), sob identificação nº 5083, com data de aprovação ética em 24/09/2025.

4.9.1 Coleta das amostras de urina

A coleta e preparo das amostras de urina humana foram realizados com base no protocolo adaptado de Bouatra et al. (2013). As amostras de urinas foram coletadas em frascos estéreis, de quatro mulheres saudáveis, voluntárias, sem uso recente de antibióticos (≤ 14 dias) e sem sintomas de infecção urinária. Após a coleta, cada amostra de urina foi homogeneizada e submetida à centrifugação leve (4000 rpm por 10 minutos) para remoção de detritos mais grosseiros (Bouatra et al., 2013). Os sobrenadantes resultantes foram reunidos em um único frasco estéril, formando um pool de urinas, a fim de reduzir a variabilidade individual e padronizar as condições de cultivo bacteriano, posteriormente este pool foi homogeneizado e filtrado a vácuo em membrana 0,22 μm . Em seguida, o pool foi dividido em alíquotas de 50 mL e armazenados em tubos Falcon estéreis a -20°C até o momento do uso.

4.9.2 Cultivo dos microrganismos em urina

Os isolados clínicos de *E. coli* foram cultivados no pool de urina estéril, utilizado como meio de cultura alternativo ao meio BHI, como uma adaptação do protocolo de Silva (2025). Para o pré-inóculo, 50 μL do estoque bacteriano congelado foram inoculados em 10 mL de urina em um tubo Falcon de 50 mL, e incubados a 37°C por 16–18 horas.

Posteriormente, o inóculo foi preparado, transferindo 1% do pré-inóculo (100 μL) para 50 mL do pool de urina estéril em Erlenmeyer de 125 mL. A cultura foi incubada a 37°C , sob agitação (Silva, 2025).

4.9.3 Curva de crescimento bacteriano em urina

Com o objetivo de acompanhar o crescimento bacteriano, foi realizada uma curva de crescimento, conforme protocolo adaptado de Rogers et al. (2022), em placa de 12 poços utilizando o equipamento CLARIOStar.

Foram utilizados 200 µL da cultura por poço, em triplicata. Os poços contendo apenas a urina estéril, sem inóculo bacteriano, foram usados como Controle Negativo. As leituras de absorbância ocorreram a 620 nm, a cada 1 hora, durante 24 horas, a 37°C (Rogers et al., 2022).

4.9.4 Detecção

Após a obtenção dos dados da curva de crescimento em urina, as culturas bacterianas foram diretamente submetidas ao ensaio de *On-Cell Western* utilizando o anticorpo AE1, seguindo o protocolo descrito no item 4.5. Para essa condição experimental, a urina estéril foi empregada como meio para o pré-inóculo e para o inóculo. Adicionalmente, foi incluído um controle negativo suplementar (CN2), constituído por urina estéril incubada com anticorpo primário e anticorpo secundário, a fim de verificar possível sinal inespecífico.

4.10 Avaliação de *Candida albicans* ATCC 5314 como possível controle negativo por On-Cell Western

Para avaliação da especificidade dos anticorpos anti-epítomos, utilizou-se a cepa *C. albicans* ATCC 5314 como possível controle negativo experimental. As células fúngicas foram submetidas diretamente ao ensaio de *On-Cell Western*, seguindo o protocolo descrito no item 4.5, sendo os experimentos realizados em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Silva (2025), em estudo ainda não publicado, demonstrou que os anticorpos policlonais produzidos a partir dos epítomos antigênicos mapeados em exoantígenos de *S. saprophyticus* foram capazes de reconhecer extratos proteicos e células intactas dessa espécie, por meio das técnicas de *Western blot* e *On-cell Western*, respectivamente. Dando continuidade a esse trabalho, o presente estudo buscou investigar se esses mesmos anticorpos mantêm capacidade de reconhecimento frente a outras espécies bacterianas de relevância clínica envolvidas em ITUs.

Com o objetivo de simplificar a nomenclatura ao longo do texto, os epítomos selecionados foram denominados como E1, E2 e E3, sendo: E1 referente ao epítomo derivado da proteína autolisina bifuncional; E2, ao epítomo oriundo de um antígeno secretor putativo; e E3, ao epítomo da proteína N-acetilmuramoi-L-alanina amidase. De forma análoga, os anticorpos policlonais resultantes de cada epítomo foram nomeados AE1, AE2 e AE3, respectivamente.

5.1 Análise *in silico* da conservação dos epítomos por BLASTp

A análise *in silico* da conservação de epítomos constitui uma etapa importante no desenvolvimento de imunodiagnósticos baseados em anticorpos, pois permite estimar o potencial de reatividade cruzada e orientar, de forma racional, a seleção de alvos antigênicos (Parvizpour et al., 2020). Nesses contextos, o reconhecimento antígeno–anticorpo depende de epítomos potencialmente acessíveis e com grau de conservação suficiente entre os microrganismos de interesse avaliados (Parvizpour et al., 2020). Ferramentas de imunoinformática têm sido amplamente empregadas para mapear a variabilidade de antígenos entre patógenos e priorizar epítomos com maior probabilidade de reconhecimento em diferentes *cepas* e espécies (Patronov; Doytchinova, 2013).

No presente trabalho, a ferramenta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) foi empregada para investigar a conservação de três epítomos lineares de 20 aminoácidos (E1, E2 e E3), previamente descritos no exoproteoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305 e utilizados para geração de anticorpos policlonais (Oliveira et al., 2023; Silva, 2025).

Na análise dos alinhamentos, o BLASTp atribui pontuações com base em uma matriz de substituição, por padrão, a *Blocks of Amino Acid Substitution Matrix* (BLOSUM62), construída a partir de frequências observadas de substituições entre aminoácidos em blocos de regiões conservadas de proteínas (Henikoff; Henikoff, 1992). Neste contexto, “substituição” refere-se a diferenças de resíduos entre sequências alinhadas. Dessa forma, substituições mais frequentes entre sequências homólogas recebem escores mais favoráveis do que substituições raras, refletindo padrões evolutivos (Henikoff; Henikoff, 1992). Nesse sistema, resíduos idênticos recebem pontuações elevadas e substituições entre aminoácidos com propriedades físico-químicas semelhantes tendem a ser menos penalizadas, por exemplo, Leucina por Isoleucina, ambos resíduos hidrofóbicos/apolares, o que preserva características locais importantes como hidrofobicidade e tamanho/encaixe da cadeia lateral (Henikoff; Henikoff, 1992; Nelson, 2022). Em contraste, trocas não conservativas/radicais, como Ácido glutâmico (ácido/negativamente carregado, hidrofílico) por Alanina (apolar), implicam mudança de carga e polaridade e, portanto, tendem a receber penalidades maiores por representarem substituições menos prováveis e potencialmente mais disruptivas no contexto estrutural (Henikoff; Henikoff, 1992; Nelson, 2022). Adicionalmente, o algoritmo aplica penalidades de *gap* para inserções e deleções, impactando o escore final do alinhamento (“BLAST Scoring and Statistics”, 2023; Henikoff; Henikoff, 1992).

A partir desses alinhamentos, o percentual de identidade corresponde à proporção de resíduos idênticos na região efetivamente alinhada, enquanto a cobertura da consulta (*query cover*) expressa a fração do comprimento da sequência de entrada representada no alinhamento (BLAST® Command Line Applications User Manual, 2008). O *E-value* estima o número esperado de alinhamentos ao acaso com escore equivalente ou superior e é diretamente proporcional ao espaço de busca, por essa razão, sua interpretação deve ser integrada às métricas de identidade e

cobertura, sobretudo quando se empregam consultas curtas, como peptídeos de 20 aminoácidos (Altschul et al., 1997; “BLAST Scoring and Statistics”, 2023).

Preliminarmente, deve-se destacar que, em todas as análises realizadas, a espécie de origem (*S. saprophyticus*), apresentou, invariavelmente, 100% de identidade e de cobertura em relação às sequências de referência dos epítomos E1, E2 e E3. Este resultado confirma a integridade dos dados de entrada e valida a conservação absoluta destes alvos na espécie de referência, servindo como controle positivo para as comparações subseqüentes com outros microrganismos.

A Tabela 3 apresenta o alinhamento do epítomo E1 entre diferentes uropatógenos, incluindo percentual de identidade, cobertura da consulta (*query cover*) e *E-value*.

Tabela 3 - Conservação do epítopo E1 entre diferentes uropatógenos.

Espécie / Acesso	Sequência alinhada	% Identidade	Query cover	E-value
S. saprophyticus (referência) WP_369083813.1	L Y K M R W N P E N P G V H Q Y A T D V	20/20 (100%)	100%	6e-15
E. coli WP_199270014.1	L Y K M R W N P A H P E T H Q Y A T D V	16/20 (80%)	100%	2e-09
K. pneumoniae WP_077266248.1	L Y K M R W N P A H P A S H Q Y A T D V	16/20 (80%)	100%	1e-09
P. mirabilis WP_368939650.1	L Y K M R W N P D A P A T M Q Y A T A V	14/20 (70%)	100%	1e-06

Alinhamento do epítopo E1 (LYKMRWNPENPGVHQYATDV), derivado de *Staphylococcus saprophyticus*, contra proteínas homólogas identificadas em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, obtidas por BLASTp utilizando o banco RefSeq Proteins. Os resíduos divergentes são destacados em vermelho. O percentual de identidade foi calculado com base no número de resíduos conservados em relação ao comprimento total do epítopo (20 aa). O query cover indica a extensão da região alinhada e o E-value expressa a significância estatística do alinhamento.

Fonte: Elaboração própria, 2026.

No estudo de referência, o E1 deriva da autolisina bifuncional (Q49WH3), proteína de grande porte descrita por Oliveira et al. (2023) com aproximadamente 1463 aminoácidos, e por Silva (2025) com massa molecular total predita de ~159,4 kDa. (Oliveira et al., 2023; Silva, 2025). Contudo, Silva (2025) ressalta que essa proteína pode sofrer processamento proteolítico, de modo que o sinal observado em *Western blot* pode corresponder a fragmentos pós-processamento que preservam o epítipo, por exemplo, a detecção de uma banda em torno de ~55 kDa reconhecida por AE1 (Silva, 2025; Zoll et al., 2010). Assim, ao interpretar a conservação do E1 em outras espécies, é importante considerar que o anticorpo pode reconhecer fragmentos contendo o epítipo (e não necessariamente a proteína íntegra), e que proteínas homólogas podem apresentar tamanhos preditos distintos e/ou padrões diferentes de clivagem, resultando em bandas de massas aparentes variadas entre espécies (Oliveira et al., 2023; Silva, 2025).

Observou-se na Tabela 3 que *E. coli* e *K. pneumoniae* compartilham 80% de identidade (16/20) com a sequência de referência, mantendo 100% de cobertura e *E-values* baixos (2e-09 e 1e-09, respectivamente). Para *P. mirabilis*, a identidade global foi de 70% (14/20), também com cobertura total e *E-value* significativo (1e-06). A cobertura de 100% nos três alinhamentos indica que toda a sequência consulta (20 aminoácidos) foi incluída no alinhamento. Assim, as diferenças observadas refletem substituições pontuais ao longo do peptídeo, e não o alinhamento de apenas um fragmento do epítipo (Fassler; Cooper, 2011). Como epítipos lineares correspondem a segmentos contíguos de aminoácidos, a preservação do trecho pode ser suficiente para manter reconhecimento antígeno–anticorpo mesmo na presença de substituições pontuais, dependendo de quais posições constituam resíduos críticos de contato (Bui et al., 2007; Sun et al., 2019).

No alinhamento do epítipo E1, observa-se que as extremidades permanecem idênticas em *E. coli* e *K. pneumoniae*, enquanto as diferenças se concentram na região central, padrão compatível com tolerância parcial a variações quando posições críticas para a interação antígeno–anticorpo permanecem preservadas (Bui et al., 2007; Sun et al., 2019). Além da identidade global, a interpretação do potencial de reconhecimento pode ser refinada pela natureza das substituições observadas. Em *E. coli*, as quatro substituições presentes (80% de identidade) são predominantemente não conservativas, envolvendo alterações de carga/polaridade, por exemplo, a troca

de Ácido glutâmico (glutamato) → Alanina, substitui um resíduo ácido/negativo por um resíduo apolar, podendo alterar o microambiente do epítopo dependendo da posição de contato (Nelson, 2022). Em *K. pneumoniae*, embora a identidade global também seja de 80%, o perfil inclui substituições não conservativas e pelo menos uma substituição conservada (Glicina → Alanina), sugerindo um padrão misto de variações no segmento alinhado (Nelson, 2022). Já em *P. mirabilis*, além da identidade menor (70%), observa-se maior número de substituições ao longo do epítopo, apesar de ocorrerem substituições conservativas, como Ácido glutâmico → Ácido aspártico, que preserva a carga negativa (Fassler; Cooper, 2011; Nelson, 2022), o conjunto de alterações incluem mudanças não conservativas adicionais, especialmente na porção final, o que pode reduzir a probabilidade de um reconhecimento mais robusto.

Ainda assim, como AE1 é um anticorpo policlonal, o reconhecimento experimental pode ocorrer mesmo na presença de substituições não conservativas, uma vez que respostas policlonais envolvem anticorpos contra múltiplos determinantes/epítomos e podem manter ligação detectável quando parte do conjunto reconhece segmentos conservados do alvo (Frank, 2002). Por fim, embora a homologia parcial observada em *P. mirabilis* seja compatível com a conservação de proteínas/domínios entre membros da ordem Enterobacterales (Kolla; Makam; Reddy, 2023), o maior número de substituições e sua distribuição no epítopo sugerem maior chance de redução de afinidade/intensidade de reconhecimento em comparação a *E. coli* e *K. pneumoniae*. Assim, os resultados *in silico* permanecem compatíveis com possibilidade de reatividade cruzada, a ser confirmada nos ensaios experimentais.

A análise de conservação do epítopo E2 apresentou um padrão semelhante ao observado para o E1, com algumas particularidades (Tabela 4).

Tabela 4 - Conservação do epítopo E2 entre diferentes uropatógenos.

Espécie / Acesso	Sequência alinhada	% Identidade	Query cover	E-value
S. <i>saprophyticus</i> (referência) WP_119497653.1	V E N V N S D G S V E V S E M N Y N G G	20/20 (100%)	100%	6e-15
<i>E. coli</i> WP_140424590.1	V E S V N S D G S V T I S E M N Y S G G	16/20 (80%)	100%	1e-07
<i>K. pneumoniae</i> WP_163596437.1	V E S V N S D G S V T I S E M N Y S G G	16/20 (80%)	100%	4e-08
<i>P. mirabilis</i> WP_275351217.1	V E Y V N S D G S I L V S E A N - - -	12/16 (75%)	80%	0.026

Alinhamento do epítopo E2 (VENVNSDGSVEVSEMNYNGG), derivado de *Staphylococcus saprophyticus*, contra proteínas homólogas identificadas em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, obtidas por BLASTp utilizando o banco RefSeq Proteins. Os resíduos divergentes são destacados em vermelho. O percentual de identidade foi calculado com base no número de resíduos conservados sobre o comprimento total do epítopo (20 aa). O *query cover* indica a extensão da região alinhada, e o *E-value* expressa a significância estatística do alinhamento.

Fonte: Elaboração própria, 2026.

O epítipo E2 deriva do antígeno secretor putativo Q49ZM2, onde de acordo com a anotação do UniProt, corresponde a uma proteína pequena (155 aminoácidos) com massa molecular predita de aproximadamente 15,9 kDa, característica compatível com um antígeno secretado.

A análise de conservação do epítipo E2 (Tabela 4) evidenciou homologia detectável em uropatógenos de interesse, com diferenças relevantes entre espécies. Em *E. coli* e *K. pneumoniae*, observou-se 80% de identidade (16/20) em relação à sequência de referência, com 100% de *query cover* e *E-values* baixos (1e-07 e 4e-08, respectivamente), compatíveis com alinhamentos significativos do segmento analisado. Diferentemente do padrão observado para E1, em E2 os resíduos conservados distribuem-se ao longo de toda a sequência, sugerindo a preservação de um núcleo de resíduos conservados dentro do epítipo linear. Esse comportamento é compatível com a literatura de epítipos de células B, na qual epítipos sequenciais são determinados pela própria sequência e a contribuição para a ligação antígeno-anticorpo não é necessariamente uniforme ao longo do trecho, podendo existir posições com maior peso para o reconhecimento (Bui et al., 2007; Kumar et al., 2023).

Além do percentual de identidade, a Tabela 4 permite qualificar o tipo de variação observada. Em *E. coli* e *K. pneumoniae*, a identidade de 80% corresponde a quatro substituições ao longo do epítipo, com predomínio de mudanças conservativas: Asparagina → Serina (polares sem carga; em duas posições) e Valina → Isoleucina (hidrofóbicos/apolares), que tendem a preservar propriedades físico-químicas locais do determinante (Nelson, 2022). Em contrapartida, observa-se uma substituição não conservativa, Ácido glutâmico (glutamato) → Treonina (ácido/negativo → polar sem carga), que altera carga/polaridade e pode impactar a afinidade dependendo da posição no epítipo reconhecido (Nelson, 2022). Esse conjunto, majoritariamente conservativo, mas com uma mudança radical, é compatível com manutenção de reconhecimento por anticorpos policlonais quando posições críticas permanecem preservadas e/ou quando diferentes frações do *pool* reconhecem sub-determinantes sobrepostos do motivo conservado (Bui et al., 2007; Sun et al., 2019).

Para *P. mirabilis*, o alinhamento recuperou apenas 16 dos 20 aminoácidos do epítopo (80% de *query cover*), com 75% de identidade (12/16) e *E-value* mais alto (0,026), indicando correspondência parcial do segmento analisado e sugerindo homologia mais fraca em relação a *E. coli* e *K. pneumoniae*. Além disso, no segmento alinhado observam-se quatro substituições (em 16 posições), com perfil misto: duas conservativas (Valina → Isoleucina; Metionina → Alanina) e duas não conservativas (Asparagina → Tirosina; Ácido glutâmico → Leucina) (Nelson, 2022). Nesse cenário, a interpretação do *E-value* deve considerar que ele depende do comprimento da sequência consultada e do espaço de busca, de modo que, em consultas curtas, é particularmente importante interpretar o *E-value* em conjunto com identidade e cobertura (Kerfeld; Scott, 2011; Kolla; Makam; Reddy, 2023). Assim, a combinação de cobertura incompleta e presença de alterações não conservativas no segmento recuperado reduz a evidência de conservação do epítopo completo e pode contribuir para menor robustez do reconhecimento do E2 em *P. mirabilis* quando comparado a *E. coli* e *K. pneumoniae*, hipótese a ser analisada em conjunto com os resultados experimentais de AE2.

Por fim, a análise *in silico* do epítopo E3 mostrou um padrão de conservação mais heterogêneo em comparação aos demais epítomos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 - Conservação do epítipo E3 entre diferentes uropatógenos.

Espécie / Acesso	Sequência alinhada	% Identidade	Query cover	E-value
S. <i>saprophyticus</i> (referência) WP_069819992.1	V F N R R A E T G Q P I S T Y W W N A D	20/20 (100%)	100%	7e-17
<i>E. coli</i> WP_218794464.1	V F D R R A Q A G S P I S T Y W S D A -	13/19(68%)	95%	6e-05
<i>K. pneumoniae</i> WP_163592061.1	V F D K R A K D G H T I S T F W - - - -	9/16(56%)	80%	2.6
<i>P. mirabilis</i> WP_436693674.1	- - - - - - - - - P I S Y P A D M Q W	8/15(53%)	40%	1.7

Alinhamento do epítipo E3 (VFNRRAETGQPISTYWWNAD), derivado de *Staphylococcus saprophyticus*, contra proteínas homólogas identificadas em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, obtidas por BLASTp utilizando o banco RefSeq Proteins. Os resíduos divergentes são destacados em vermelho. O percentual de identidade foi calculado com base no número de resíduos conservados sobre o comprimento total do epítipo (20 aa). O *query cover* indica a extensão da região alinhada, e o *E-value* expressa a significância estatística do alinhamento.

Fonte: Elaboração própria, 2026.

O epítipo E3 foi descrito por Silva (2025) como derivado da proteína N-acetilmuramoyl-L-alanina amidase (Q49VK7) de *S. saprophyticus*, cuja massa molecular predita é de aproximadamente 28,2 kDa. No mesmo estudo, apesar desse tamanho teórico, o *Western blot* evidenciou espécies com massa aparente superior, o que foi interpretado como compatível com oligomerização/associação e/ou outras formas de processamento (Silva, 2025). Assim, a análise *in silico* do E3 (Tabela 5) se destaca por apresentar conservação mais restrita e, principalmente, redução progressiva da cobertura do epítipo completo nos uropatógenos avaliados.

Em *E. coli*, observou-se 68% de identidade (13/19), com 95% de *query cover* e *E-value* 6e-05, indicando que quase todo o segmento do epítipo foi recuperado no alinhamento, embora com substituições. Em *K. pneumoniae*, o alinhamento foi mais fragmentado, com 56% de identidade (9/16), 80% de *query cover* e *E-value* 2,6, sugerindo menor evidência de conservação do epítipo integral. Para *P. mirabilis*, observa-se o quadro mais restritivo: 40% de *query cover* com 53% de identidade (8/15) e *E-value* 1,7, indicando homologia limitada e ausência de correspondência completa do epítipo no segmento recuperado.

A Tabela 5 permite qualificar o tipo de variação observada no epítipo E3. Em *E. coli*, no trecho alinhado foram identificadas seis substituições, com predomínio de mudanças não conservativas (4/6), incluindo alterações de carga/polaridade (por exemplo, asparagina → ácido aspártico) e uma troca considerada mais radical (triptofano → serina); duas substituições foram mais moderadas/conservativas (por exemplo, glutamina → serina e ácido glutâmico → glutamina) (Nelson, 2022). Em *K. pneumoniae*, observaram-se sete substituições, com duas conservativas (arginina → lisina; tirosina → fenilalanina) e predominância de não conservativas (5/7), incluindo uma mudança de carga particularmente marcada (ácido glutâmico → lisina) (Nelson, 2022). Já em *P. mirabilis*, as substituições no trecho recuperado foram integralmente não conservativas (7/7), incluindo trocas que alteram classe químico-estrutural (por exemplo, treonina → tirosina; triptofano → ácido aspártico) e mudanças envolvendo prolina (tirosina → prolina), o que, somado à baixa cobertura do alinhamento (40%), reduz a evidência de conservação do epítipo E3 nessa espécie e pode se refletir em menor robustez/intensidade de reconhecimento por AE3 (Bui et al., 2007).

Na sequência, esses achados serão relacionados aos perfis de reatividade observados nos ensaios de *On-Cell Western*, permitindo avaliar em que medida o grau de identidade observado se traduz em reconhecimento experimental pelos anticorpos policlonais.

5.1.1 Considerações sobre limitações do banco de dados / curadoria taxonômica

Considerando em conjunto as análises de E1, E2 e E3, ressalta-se ainda a ausência de alinhamentos significativos para *K. variicola* no banco de dados utilizado. Esse resultado *in silico* reflete prováveis limitações na curadoria de bancos de dados genômicos. Conforme elucidado por Barrios-Camacho et al. (2019), isolados de *K. variicola* são frequentemente subnotificados ou erroneamente classificados como *K. pneumoniae* em repositórios públicos, dificultando a identificação de homologias via ferramentas de alinhamento padrão (Barrios-Camacho et al., 2019). Nesse contexto, considerando a proximidade filogenética entre *K. pneumoniae* e *K. variicola* e a frequente identificação equivocada entre as duas espécies, é plausível que parte dos perfis de homologia observados para *K. pneumoniae* também se aplique a *K. variicola*, contudo, essa extrapolação deve ser interpretada com cautela, uma vez que diferenças genômicas entre espécies próximas podem afetar a conservação de epítomos específicos, reforçando a importância de validação experimental.

5.2 Os anticorpos policlonais anti-epítomos demonstraram capacidade de reconhecer células intactas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. variicola*

A capacidade de reconhecimento dos anticorpos AE1, AE2 e AE3 frente a células intactas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. variicola* foi investigada por meio da técnica de *On-cell Western* (Figura 5) (Brockmüller et al., 2023). Para isso, os anticorpos primários foram empregados na diluição de 1:2000, e as células bacterianas foram testadas em diluições seriadas de 1:10¹ a 1:10⁵. Além disso, três isolados distintos de cada espécie foram analisados como réplicas biológicas, permitindo examinar a consistência do reconhecimento imunológico e a

heterogeneidade entre amostras bacterianas independentes (Blainey; Krzywinski; Altman, 2014).



Figura 5 - Detecção de células intactas de *E. coli* (A), *K. pneumoniae* (B) e *K. variicola* (C) por meio dos anticorpos anti-epítipo 1 (AE1), 2 (AE2) e 3 (AE3), utilizando a técnica de *On-Cell Western*. CN corresponde ao Controle Negativo, no qual o anticorpo primário não foi adicionado. Os anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:2000, e todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, proveniente do kit ECL, diluído a 1:4000. A visualização foi realizada por quimioluminescência, e as imagens foram adquiridas com o equipamento L-Pix Chemi com exposição de 20 minutos em cada experimento.

Conforme observado nas imagens do *On-Cell Western*, os três anticorpos reconheceram não apenas *E. coli*, mas também *K. pneumoniae* e *K. variicola*, indicando que os epítipos avaliados não promoveram reatividade restrita a uma única

espécie bacteriana. Entretanto, esse reconhecimento não ocorreu de forma completamente uniforme entre os diferentes isolados e anticorpos. As próprias imagens qualitativas já sugeriam variação na intensidade do sinal quimioluminescente entre as *cepas* de uma mesma espécie, e essa tendência foi corroborada pelos gráficos de intensidade relativa após correção pelo controle negativo e normalização intra-réplica biológica (Figura 6, 7 e 8). Nos perfis densitométricos, observou-se, de modo geral, aumento do sinal relativo nas diluições mais altas, especialmente entre $1:10^3$ e $1:10^5$, embora com diferenças no comportamento de cada anticorpo e na amplitude da resposta entre as bactérias analisadas.

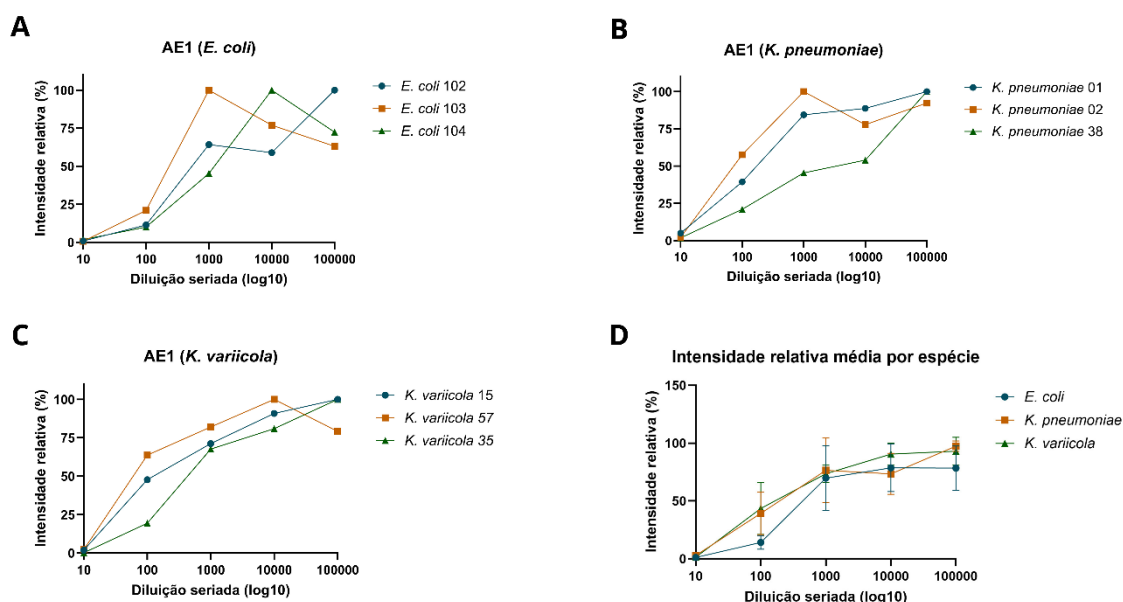


Figura 6 - Intensidade relativa do sinal quimioluminescente obtido no ensaio de *On-cell Western* para os isolados bacterianos incubados com o anticorpo AE1 ao longo de diluições seriadas celulares. (A) *Escherichia coli*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Klebsiella variicola*; (D) intensidade relativa média por espécie, calculada a partir dos três isolados analisados em cada diluição, com barras representando o desvio-padrão. Os valores foram obtidos por análise densitométrica no software ImageJ/Fiji, corrigidos pelo controle negativo e normalizados em relação ao maior sinal de cada réplica biológica, definido como 100%.

Para AE1 (Figura 5A e Figura 6), os gráficos mostraram um perfil relativamente consistente entre as três espécies, com intensidades relativas mais elevadas concentradas sobretudo entre $1:10^3$ e $1:10^5$. Em *E. coli*, os três isolados apresentaram incremento progressivo do sinal, com máximos distribuídos entre $1:10^3$ e $1:10^5$. Em *K. pneumoniae*, observou-se comportamento semelhante, embora com maior variação entre as *cepas* 01, 02 e 38. Já em *K. variicola*, o sinal também mostrou-se mais intenso

nas diluições mais altas, especialmente para as amostras 15 e 35. Esse padrão é compatível com a análise *in silico* do epítopo E1, na qual *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram 80% de identidade, 100% de cobertura e *E-values* baixos. Assim, o comportamento experimental de AE1 frente a *E. coli* e *K. pneumoniae* é coerente com a maior conservação predita para E1 nessas espécies.

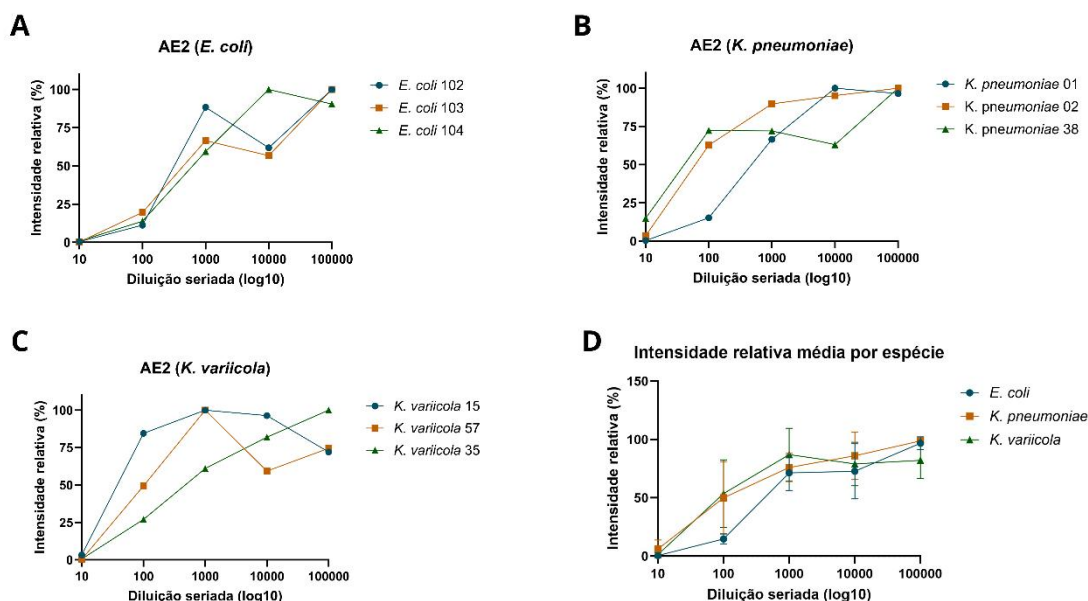


Figura 7 - Intensidade relativa do sinal quimioluminescente obtido no ensaio de *On-cell Western* para os isolados bacterianos incubados com o anticorpo AE2 ao longo de diluições seriadas celulares. (A) *Escherichia coli*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Klebsiella variicola*; (D) intensidade relativa média por espécie, calculada a partir dos três isolados analisados em cada diluição, com barras representando o desvio-padrão. Os valores foram obtidos por análise densitométrica no software ImageJ/Fiji, corrigidos pelo controle negativo e normalizados em relação ao maior sinal de cada réplica biológica, definido como 100%.

Para AE2 (Figura 5B e Figura 7), o padrão experimental também sustentou reatividade frente às três espécies, mas com variação entre isolados. Em *E. coli*, dois isolados atingiram sinal máximo em 1:10⁵, enquanto um deles mostrou pico em 1:10⁴. Em *K. pneumoniae*, a tendência geral de maior intensidade relativa em 1:10⁴ – 1:10⁵ foi mantida, mas com diferenças entre as amostras. E em *K. variicola*, verificou-se novamente heterogeneidade, com dois dos isolados atingindo 100% já em 1:10³, enquanto o outro apresentou resposta mais tardia. Esses resultados dialogam com a análise *in silico* de E2, que evidenciou 80% de identidade e 100% de cobertura para *E. coli* e *K. pneumoniae*, com *E-values* baixos, indicando conservação detectável e relativamente robusta.

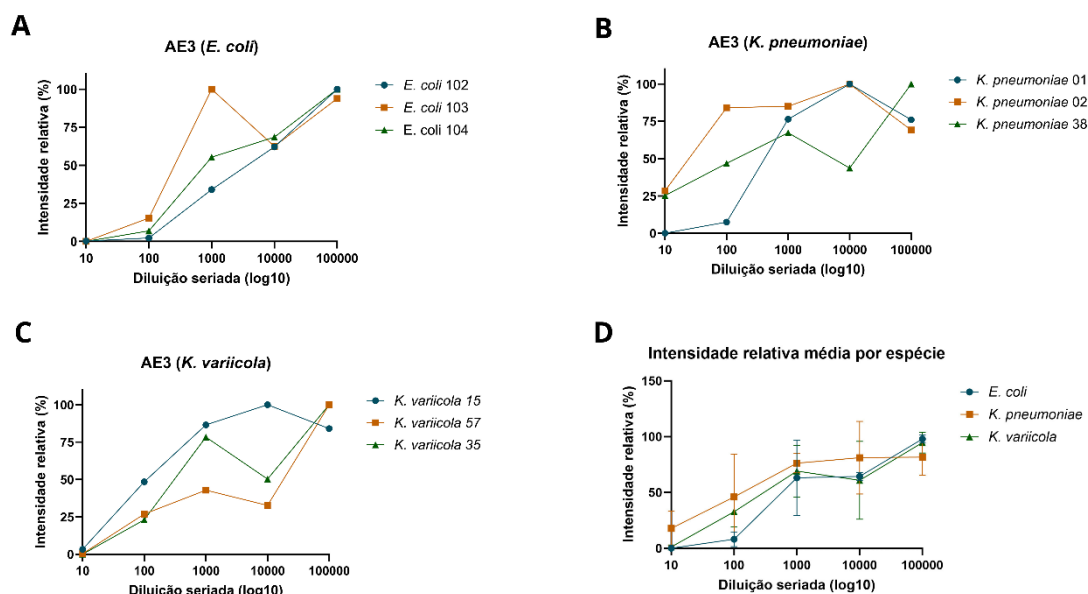


Figura 8 - Intensidade relativa do sinal quimioluminescente obtido no ensaio de *On-cell Western* para os isolados bacterianos incubados com o anticorpo AE3 ao longo de diluições seriadas celulares. (A) *Escherichia coli*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Klebsiella variicola*; (D) intensidade relativa média por espécie, calculada a partir dos três isolados analisados em cada diluição, com barras representando o desvio-padrão. Os valores foram obtidos por análise densitométrica no software ImageJ/Fiji, corrigidos pelo controle negativo e normalizados em relação ao maior sinal de cada réplica biológica, definido como 100%.

Já AE3 (Figura 5C e Figura 8) apresentou o perfil mais heterogêneo entre os três anticorpos, sobretudo em *K. variicola*. Embora tenha havido reconhecimento nas três espécies, os máximos relativos distribuíram-se de forma menos uniforme entre as diluições, e a oscilação entre as *cepas* foi mais evidente. Em *E. coli*, o aumento do sinal em geral ocorreu das diluições intermediárias para as mais altas. Em *K. pneumoniae*, a resposta variou mais fortemente entre os três isolados, e, em *K. variicola*, o comportamento foi o mais irregular, com picos em diferentes diluições dependendo da amostra avaliada. Esse padrão experimental é compatível com a análise *in silico* do epítipo E3, que mostrou conservação mais restrita em comparação com E1 e E2: para *E. coli*, observou-se 68% de identidade com 95% de cobertura e *E-value* de 6e-05, para *K. pneumoniae*, 56% de identidade, 80% de cobertura e *E-value* de 2,6. Em conjunto, esses achados sugerem que a maior heterogeneidade experimental de AE3 pode refletir a menor conservação relativa, observada nas análises *in silico*, do epítipo correspondente.

A análise estatística dos dados normalizados por ANOVA *one-way* indicou diferença significativa entre as diluições avaliadas e entre os isolados de uma mesma espécie ($p < 0,05$), corroborando quantitativamente a tendência observada nos gráficos de que o sinal relativo variou em função da diluição celular. No entanto, como o experimento foi conduzido com triplicatas biológicas, sem replicatas técnicas, essa inferência deve ser interpretada de forma complementar e exploratória. Adicionalmente, como a normalização foi realizada intra-réplica biológica, definindo-se o maior valor de cada curva como 100%, os resultados expressam principalmente o perfil relativo de reatividade ao longo das diluições, e não medidas absolutas de intensidade comparáveis entre todas as condições. Assim, mais do que demonstrar diferença estatística entre as diluições, a análise evidenciou que, de modo geral, os maiores sinais relativos se concentraram nas diluições $1:10^3$, $1:10^4$ e $1:10^5$ para os três microrganismos testados.

Contudo, o ponto de máxima intensidade relativa não foi idêntico para todos os isolados, uma vez que, em alguns casos, o pico de reatividade foi observado em $1:10^5$, em outros casos o pico ocorreu em $1:10^3$ ou $1:10^4$, seguido de discreta redução em $1:10^5$. Esse comportamento sugere que o reconhecimento imunológico não depende exclusivamente da quantidade de células presente no ensaio, mas também da relação entre densidade celular, disponibilidade de epítomos acessíveis e eficiência de interação antígeno-anticorpo (Méchin; Rousset; Girardeau, 1996). Em ensaios realizados com células intactas, pequenas variações na exposição superficial, na abundância, na conformação e no processamento dos alvos antigênicos podem influenciar o perfil de reatividade observado, uma vez que a acessibilidade dos epítomos e a disponibilidade dos alvos na superfície celular interferem diretamente na interação com os anticorpos (Méchin; Rousset; Girardeau, 1996; Vollmer et al., 2008). Assim, os resultados obtidos não indicam um comportamento estritamente linear, mas sim a existência de uma faixa ótima de detecção relativa, concentrada, de modo geral, entre $1:10^3$ e $1:10^5$, embora sujeita a oscilações entre *cepas* bacterianas e a possíveis interferências analíticas do ensaio (Tate; Ward, 2004).

Já a menor intensidade observada nas diluições mais baixas pode estar relacionada à maior densidade celular e à maior carga antigênica nessas condições, o que potencialmente dificulta a interação antígeno-anticorpo ou favorece interferências analíticas no ensaio (Tate; Ward, 2004). Em imunoenaios, esse tipo de

comportamento já foi descrito em amostras mais concentradas e pode estar associado a excesso de analito/antígeno e a resposta não linear do sinal ao longo das diluições (Tate; Ward, 2004). Nesse contexto, a variabilidade observada entre os isolados de uma mesma espécie pode refletir diferenças na expressão e na exposição superficial dos antígenos, contribuindo para as variações na intensidade do sinal quimioluminescente detectado experimentalmente (Klimka et al., 2021; Méchin; Rousset; Girardeau, 1996; Vollmer et al., 2008).

Do ponto de vista biológico, o reconhecimento observado neste estudo era esperado, uma vez que os anticorpos policlonais foram produzidos frente a epítomos derivados de proteínas antigênicas de *S. saprophyticus* associadas ao metabolismo e ao remodelamento da parede celular (Oliveira et al., 2023). Entre esses alvos estão a autolisina bifuncional (Q49WH3), descrita como proteína extracelular no exoproteoma de *S. saprophyticus*, a proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidase (Q49VK7) e o antígeno secretor putativo (Q49ZM2), este último anotado como relacionado ao metabolismo da parede celular e portador de domínio CHAP (*Cysteine, Histidine-dependent Amidohydrolases/Peptidases*) (Rossi et al., 2009). No estudo de Oliveira et al. (2023), esses antígenos deram origem a epítomos hidrofílicos homólogos à epítomos de outras bactérias causadoras de ITU, incluindo *E. coli* e *K. pneumoniae*, o que já indicava a possibilidade de reconhecimento cruzado. Além disso, hidrolases de peptidoglicano, como amidases, glucosaminidases, transglicosilases líticas e outras autolisinas, constituem um grupo amplo de enzimas bacterianas com papel central na divisão celular, separação das células-filhas, renovação estrutural da parede e autólise, favorecendo a conservação funcional de determinados domínios entre espécies distintas (Bourgeois et al., 2009; Mitchell et al., 2021; Vollmer et al., 2008). No caso do antígeno secretor putativo (Q49ZM2), a presença de um domínio CHAP reforça ainda mais essa plausibilidade, uma vez que proteínas dessa superfamília atuam como amidohidrolases/peptidases envolvidas na clivagem do peptidoglicano e estão amplamente distribuídas no reino bacteriano (Rossi et al., 2009). Assim, acredita-se que a reatividade observada frente a *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. variicola* não deve ser interpretada como um achado inesperado, mas como um resultado compatível com a conservação parcial de regiões antigênicas em proteínas envolvidas na fisiologia da parede celular bacteriana.

No caso de *K. variicola*, a ausência de alinhamentos significativos no banco de dados utilizado não invalida os achados experimentais. Pelo contrário, essa discrepância entre os dados *in silico* e o reconhecimento observado no *On-Cell Western* reforça a necessidade de cautela na interpretação bioinformática, especialmente diante das limitações de curadoria taxonômica já descritas para essa espécie (Barrios-Camacho et al., 2019). Como discutido anteriormente, *K. variicola* é frequentemente subnotificada ou classificada como *K. pneumoniae* em repositórios públicos, o que pode dificultar a recuperação de proteínas homólogas por BLASTp (Barrios-Camacho et al., 2019). Assim, a reatividade experimental frente a *K. variicola* ganha relevância adicional, pois sugere a presença de determinantes antigênicos compartilhados ou funcionalmente relacionados, mesmo quando essa correspondência não é prontamente recuperada por ferramentas de alinhamento.

Em conjunto, esses achados ganham relevância quando comparados ao panorama atual de desenvolvimento de imunodiagnósticos para ITU. Na literatura, alguns estudos concentram-se na produção de anticorpos dirigidos à detecção de um único agente etiológico, como *E. coli* em testes imunocromatográficos de fluxo lateral, nos quais a especificidade do anticorpo é explorada para reconhecimento direcionado do patógeno-alvo (Da Cunda et al., 2024). Em contraste, a proposta do presente estudo foi investigar anticorpos policlonais gerados a partir de epítomos previamente identificados em *S. saprophyticus*, mas com potencial de reconhecer diferentes bactérias uropatogênicas. Essa abordagem se aproxima, em parte, do objetivo de testes rápidos para bacteriúria, como o RapidBac, descrito por Stapleton et al. (2015), embora naquele caso o método tenha sido baseado em anticorpos monoclonais voltados principalmente para bacteriúria significativa por uropatógenos Gram-negativos (Stapleton et al., 2015). Assim, embora ainda em caráter exploratório, os resultados aqui obtidos sugerem que o uso de anticorpos anti-epítomos com reconhecimento ampliado pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento futuro de ferramentas imunodiagnósticas mais rápidas aplicadas à triagem de ITUs.

Essa possibilidade é particularmente relevante diante da diversidade de agentes etiológicos envolvidos nas ITUs e da necessidade de métodos diagnósticos que reduzam o tempo de resposta em relação à urocultura. Embora a cultura permaneça como padrão-ouro, a demora de 24 a 48 horas para liberação dos

resultados sustenta a busca por abordagens rápidas e de fácil execução, especialmente em contextos de triagem e apoio à decisão clínica (Sujith; Solomon; Rayappan, 2024).

Adicionalmente, a técnica de *On-Cell Western* empregada neste estudo mostrou-se útil como plataforma experimental para demonstrar o reconhecimento de células bacterianas intactas, sem a necessidade de extração proteica prévia. Ainda que sua aplicação rotineira dependa de equipamento para detecção de quimioluminescência, os resultados obtidos indicam que os anticorpos AE1, AE2 e AE3 podem futuramente ser adaptados para outros formatos diagnósticos, como ensaios em membrana ou testes imunocromatográficos, à semelhança de estratégias já exploradas para detecção de uropatógenos em urina (Da Cunda et al., 2024; Stapleton et al., 2015).

Além da aplicação potencial no contexto das ITUs, a capacidade de reconhecer células bacterianas intactas mesmo em diluições elevadas ($1:10^5$) sugere que esses anticorpos também possam ser explorados, futuramente, em outras abordagens de detecção bacteriana. Entre essas possibilidades, podem ser considerados contextos que demandam alta sensibilidade analítica, como o monitoramento microbiológico de amostras e produtos que requerem controle de esterilidade, bem como investigações voltadas à detecção de bacteremia em matrizes clínicas mais complexas. Contudo, essas aplicações extrapolam o escopo do presente estudo e exigiriam validação específica quanto à sensibilidade, especificidade e interferência de matriz em cada condição analisada.

Considerando os achados obtidos, a determinação da faixa de detecção dos anticorpos representa uma continuidade natural da caracterização de seu desempenho analítico.

5.2.1 Considerações sobre a avaliação experimental de *Proteus mirabilis*

Embora as análises *in silico* tenham indicado similaridade parcial entre os epítomos avaliados e sequências de *P. mirabilis*, a validação experimental dessa espécie apresentou limitações que impediram uma interpretação conclusiva dos resultados. Nos ensaios de *On-Cell Western*, observou-se sinal recorrente no controle negativo, comprometendo a distinção segura entre reconhecimento específico e

background experimental. A repetição dos experimentos em dias distintos e a inclusão de diferentes isolados de *P. mirabilis* não foram suficientes para eliminar esse comportamento, indicando que o problema não se restringiu a um único ensaio ou a uma única amostra bacteriana. Dessa forma, o *background* observado permaneceu como uma limitação metodológica do ensaio nas condições testadas. Em protocolos de imunodeteção quimioluminescente, *background* elevado pode estar associado a bloqueio insuficiente, reatividade cruzada com proteínas do bloqueio, uso excessivo de conjugado enzimático ou a condições do sistema de detecção utilizado, exigindo otimização experimental dessas variáveis para obtenção de um sinal mais específico (Alegria-Schaffer; Lodge; Vattem, 2009).

Diante disso, uma das hipóteses para o sinal observado no controle negativo é a ocorrência de ligação inespecífica envolvendo o sistema de detecção e componentes de superfície de *P. mirabilis*. Entre esses componentes, modificações no LPS e diferentes O-antígenos merecem consideração, pois alteram propriedades da superfície bacteriana e podem influenciar interações em contextos imunológicos e experimentais (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018). Ainda assim, essa possibilidade deve ser considerada com cautela, uma vez que não pôde ser confirmada experimentalmente nas condições deste estudo.

5.3 Delimitação experimental da faixa de detecção do anticorpo AE1 por titulação em *On-Cell Western*

Com base nos resultados do ensaio de *On-Cell Western*, a etapa seguinte consistiu na titulação do AE1, com o objetivo de delimitar experimentalmente sua faixa de detecção e aprofundar a caracterização de seu desempenho analítico. Para essa etapa, optou-se apenas pelo uso do anticorpo AE1, em razão de seu desempenho mais consistente nos ensaios prévios de reconhecimento, o que justificou sua escolha para a caracterização inicial do limite de detecção.

A avaliação da faixa de detecção do anticorpo é relevante porque contribui para a caracterização da sensibilidade analítica e da faixa útil de detecção do ensaio,

permitindo avaliar em que condições o sinal quimioluminescente ainda pode ser documentado e comparado de forma confiável (Alegria-Schaffer; Lodge; Vattem, 2009; Fournier; Brons; Taucher-Scholz, 2003).

Nas investigações iniciais de reconhecimento bacteriano, o sinal quimioluminescente já podia ser observado após poucos minutos de exposição. Entretanto, para fins de documentação visual e melhor apresentação das imagens representativas, também foram utilizadas exposições mais prolongadas (~20min). Já no neste ensaio, realizado com AE1 frente a uma *cepa* de *E. coli* (*E. coli* 104) em triplicata técnica e em diferentes diluições do anticorpo, optou-se por tempos de exposição reduzidos, variando de segundos a poucos minutos, com o objetivo de minimizar saturação do sinal, reduzir *background* e preservar uma faixa de leitura mais adequada para comparação entre as diluições testadas (Alegria-Schaffer; Lodge; Vattem, 2009; Fournier; Brons; Taucher-Scholz, 2003).

Nesta avaliação (Figura 9), o anticorpo AE1 apresentou sinal quimioluminescente detectável ao longo de várias diluições testadas, com redução progressiva da intensidade à medida que a concentração do anticorpo diminuía. As diluições mais concentradas geraram sinais mais intensos e bem definidos, enquanto nas diluições mais elevadas a marcação tornou-se progressivamente mais tênue.

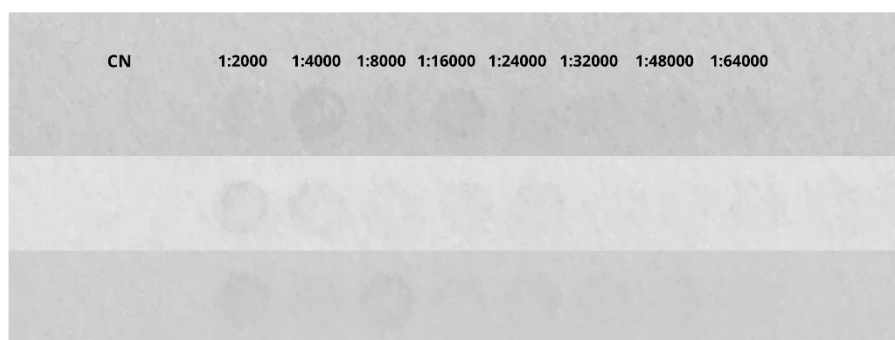


Figura 9 - Sinal quimioluminescente obtido no ensaio de *On-Cell Western* para delimitação experimental da faixa de detecção do anticorpo AE1 frente ao isolado *Escherichia coli* 104. O ensaio foi realizado em triplicata técnica, utilizando diluições seriadas do anticorpo de 1:2.000 a 1:64.000. **CN**: controle negativo. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, proveniente do kit ECL, diluído a 1:4000. A visualização foi realizada por quimioluminescência, e as imagens foram adquiridas com o equipamento L-Pix Chemi com exposições entre 10 segundos e 3 minutos em cada experimento.

A análise densitométrica semiquantitativa do anticorpo AE1 confirmou o padrão de resposta dependente da diluição (Figura 10), caracterizado por redução

progressiva da intensidade quimioluminescente à medida que a concentração do anticorpo diminuiu.

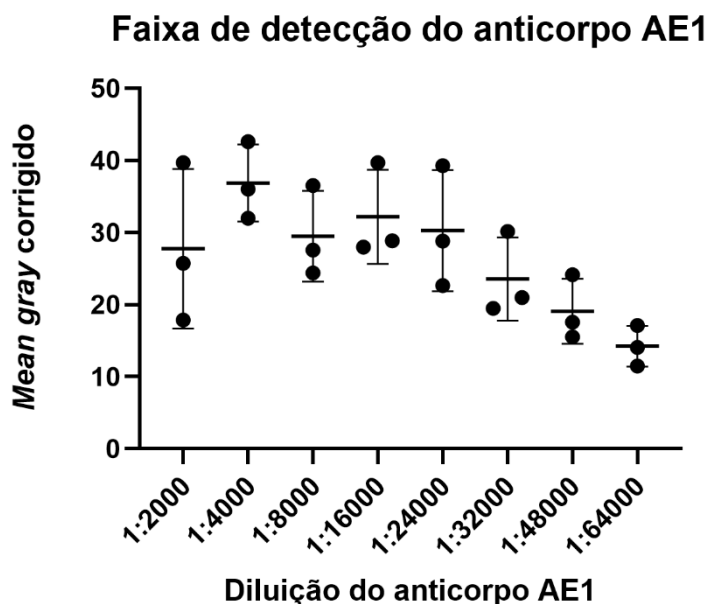


Figura 10 - Análise densitométrica semiquantitativa da delimitação experimental da faixa de detecção do anticorpo AE1 por *On-Cell Western*. Valores de *mean gray* corrigido obtidos por ImageJ/Fiji para as diferentes diluições do anticorpo AE1, em triplicata técnica, frente ao isolado *Escherichia coli* 104. O *mean gray* corrigido corresponde à intensidade média do sinal quimioluminescente de cada poço após subtração do valor do controle negativo da mesma réplica. Os pontos representam os valores individuais das réplicas técnicas; a barra horizontal indica a média e as barras verticais, o desvio-padrão.

De modo geral, as maiores médias de *mean gray* corrigido concentraram-se nas diluições iniciais e intermediárias, enquanto as menores intensidades foram verificadas nas diluições mais elevadas, especialmente entre 1:32.000 e 1:64.000. Esse comportamento permitiu delimitar experimentalmente a faixa em que o AE1 apresentou melhor desempenho no ensaio, bem como identificar a região em que a resposta se tornou progressivamente mais reduzida. Tal achado é compatível com o princípio da titulação de anticorpos, segundo o qual a diminuição da disponibilidade do reagente tende a impactar a intensidade do reconhecimento, sendo a condição ideal aquela capaz de proporcionar melhor separação entre sinal específico e fundo (Bonilla et al., 2024).

Além disso, a interpretação desses resultados deve considerar que sinais obtidos por detecção quimioluminescente não apresentam, necessariamente, relação linear com a quantidade de alvo, podendo variar conforme o anticorpo e as condições do ensaio (Charette et al., 2010). Nesse contexto, a estratégia de diluição seriada

adotada neste estudo mostrou-se particularmente relevante, por permitir uma avaliação mais consistente do comportamento do AE1 ao longo da titulação e fortalecer a interpretação semiquantitativa dos dados. Charette et al. (2010) destacam, inclusive, que a realização de séries de diluição aumenta a precisão da análise e pode evidenciar de forma mais adequada a significância dos resultados obtidos em ensaios com quimioluminescência (Charette et al., 2010).

Em conjunto, os dados obtidos demonstram que o ensaio foi capaz de caracterizar a faixa final de resposta do AE1 nas condições avaliadas, evidenciando redução mais pronunciada do sinal nas diluições mais extremas. Assim, mais do que estabelecer um ponto absoluto de interrupção da detecção, os resultados permitiram definir experimentalmente a região em que a resposta do anticorpo passa a se tornar mais limitada, contribuindo para a determinação do seu limite de detecção no contexto do *On-Cell Western*.

5.4 Detecção direta de bactérias cultivadas em urina por *On-Cell Western*

Para avaliar a detecção direta de bactérias em condição mais próxima do contexto de infecção urinária, células de *E. coli* cultivadas em urina foram submetidas ao ensaio de *On-Cell Western* utilizando o anticorpo AE1, com diluições celulares variando de $1:10^1$ a $1:10^{15}$ (Figura 11). Considerando que a urina constitui a matriz natural na qual esses microrganismos se encontram durante o processo infeccioso, essa etapa permitiu avaliar o desempenho dos anticorpos em uma condição mais complexa e restritiva do que o meio de cultura rico.

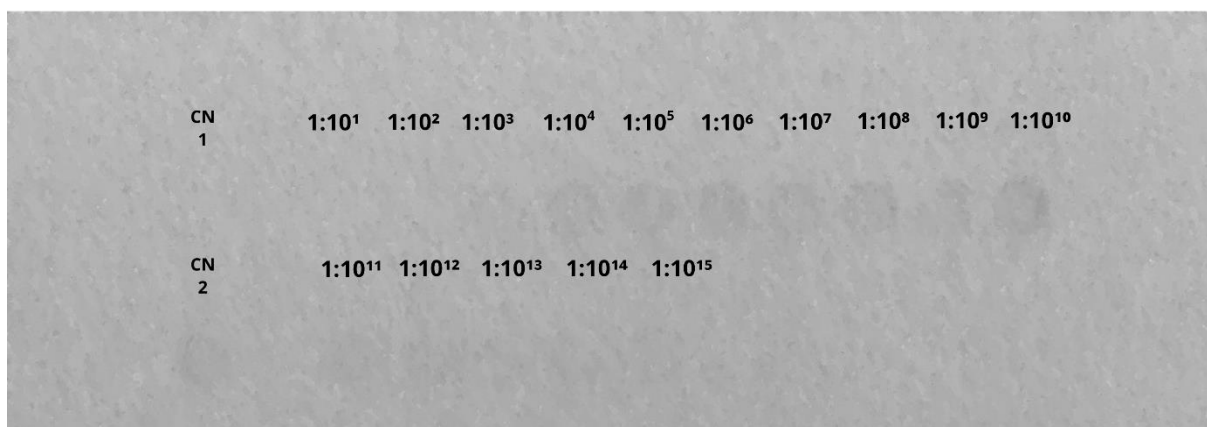


Figura 11 - Detecção de *Escherichia coli* cultivada em urina por *On-Cell Western* utilizando o anticorpo AE1. Células de *E. coli* cultivadas em urina foram submetidas ao ensaio em série de diluições de $1:10^1$ a $1:10^{15}$. **CN1:** controle negativo sem anticorpo primário. **CN2:** urina filtrada sem inoculação bacteriana, incubada com anticorpo primário e secundário. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, proveniente do kit ECL, diluído a 1:4000. A visualização foi realizada por quimioluminescência, e as imagens foram adquiridas com o equipamento L-Pix Chemi com exposições entre 10 segundos e 3 minutos em cada experimento.

Observou-se manutenção de sinal quimioluminescente ao longo da série testada, com tendência de redução da intensidade à medida que as diluições aumentavam, sugerindo relação entre a quantidade de células bacterianas e o nível de reconhecimento imunológico.

Durante a aquisição das imagens, optou-se por tempos de exposição reduzidos, variando de segundos a poucos minutos, com o objetivo de minimizar a saturação do sinal, reduzir o *background* e preservar uma faixa de leitura mais adequada para comparação entre as diluições. Ainda assim, o controle CN2, composto por urina filtrada sem inoculação bacteriana e incubado com anticorpo primário e secundário, apresentou discreto sinal de fundo. Esse resultado pode refletir *background* inerente à matriz urinária ou possível interação inespecífica com alguns de seus componentes. A urina é uma matriz biológica complexa, composta por ureia, sais inorgânicos, creatinina, amônia, ácidos orgânicos e diversos outros solutos, cuja composição pode variar substancialmente (Bouatra et al., 2013). Essa heterogeneidade pode interferir no desempenho de ensaios imunológicos, uma vez que parâmetros da matriz, como pH, eletrólitos, solutos, proteínas e carboidratos, podem afetar a formação dos complexos antígeno-anticorpo e contribuir para o aumento do sinal basal (Taylor et al., 2012).

Nesse contexto, o discreto sinal observado no CN2 pode ser compatível com um efeito de matriz, e não necessariamente com reconhecimento específico de alvos bacterianos. Esse tipo de interferência já foi descrito em ensaios imunológicos aplicados à urina, nos quais a composição da amostra pode afetar a sensibilidade, a reprodutibilidade e a acurácia das medições, inclusive de maneira variável entre diferentes amostras e analitos (Chiu et al., 2010; Taylor et al., 2012).

A persistência do sinal mesmo após modificações no protocolo, como bloqueio com caseína a 5% e aumento do número de lavagens, reforça a hipótese de que a interferência observada esteja relacionada, ao menos em parte, a características intrínsecas da própria matriz urinária, e não apenas a uma etapa isolada do procedimento experimental. Achados desse tipo são coerentes com estudos que mostram que ajustes metodológicos simples nem sempre são suficientes para eliminar completamente os efeitos de matriz em urina (Taylor et al., 2012).

Como essa etapa foi conduzida com caráter exploratório, envolvendo diferentes ajustes metodológicos, como alterações no bloqueio, no número de lavagens e nos tempos de exposição, os resultados foram analisados de forma predominantemente qualitativa. Nesse contexto, a ausência de replicatas obtidas sob condições plenamente padronizadas limitou a realização de uma análise densitométrica comparativa robusta.

Sob essa perspectiva, a avaliação do *On-Cell Western* em bactérias cultivadas em urina permitiu avançar de uma condição experimental controlada para uma situação biologicamente mais desafiadora e potencialmente mais relevante do ponto de vista diagnóstico. Embora o reconhecimento observado para *E. coli* com o anticorpo AE1 represente um achado promissor, o sinal detectado no controle contendo apenas urina evidencia que a matriz urinária impõe limitações adicionais à interpretação do ensaio. Portanto, esse conjunto de dados sustenta o potencial da abordagem, mas também delimita a necessidade de novas otimizações para aumentar sua especificidade analítica em matrizes complexas. Em análises futuras, poderão ser investigadas estratégias alternativas de detecção, incluindo a substituição do kit atualmente empregado ou mesmo a adoção de outras abordagens de revelação do sinal, com o objetivo de reduzir interferências da matriz urinária e aprimorar o desempenho analítico do ensaio.

5.5 Ausência de reconhecimento de *Candida albicans* pelos anticorpos anti-epítomos

Para avaliar a especificidade dos anticorpos anti-epítomos frente a alvos bacterianos, o ensaio de *On-Cell Western* também foi aplicado a células de *C. albicans* (Figura 12). Não foi observado sinal detectável de reconhecimento de *C. albicans* pelos anticorpos avaliados nas condições do ensaio, resultado compatível com a natureza não bacteriana desse microrganismo.

A escolha desse microrganismo foi relevante não apenas por se tratar de um organismo não bacteriano, mas também por sua importância clínica no trato urinário, uma vez que *C. albicans* é descrita como a principal causa de infecções fúngicas nosocomiais do trato urinário e importante agente de candidúria (presença de leveduras do gênero *Candida* na urina), especialmente em indivíduos hospitalizados e imunocomprometidos (Behzadi; Behzadi; Ranjbar, 2015). Assim, sua inclusão no presente estudo permitiu testar os anticorpos em um contexto biologicamente plausível, porém estruturalmente distinto das bactérias uropatogênicas avaliadas.

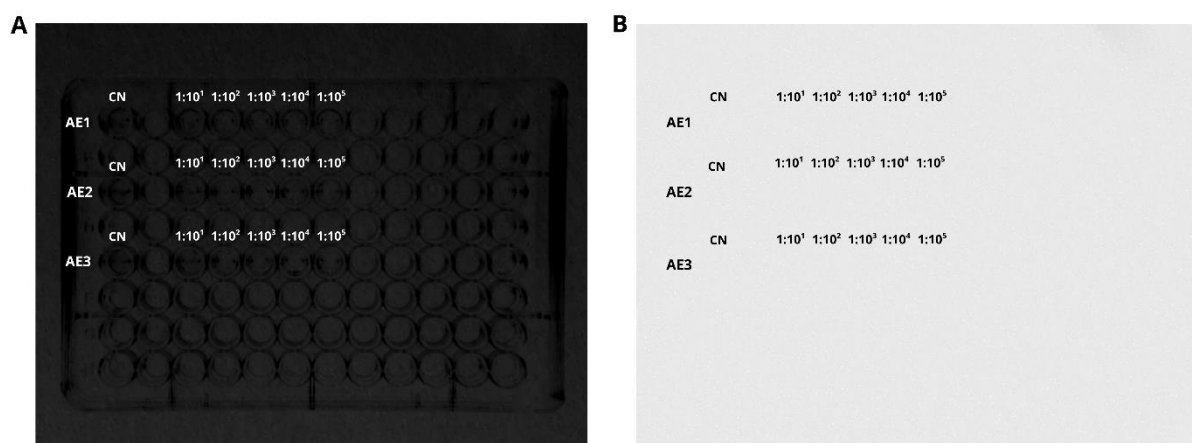


Figura 12 - Detecção de células intactas de *C. albicans* por meio dos anticorpos anti-epítopo 1 (AE1), 2 (AE2) e 3 (AE3), utilizando a técnica de *On-Cell Western*. (A) Imagem com sobreposição de luz visível e quimioluminescência; (B) Imagem de quimioluminescência pura da mesma placa. CN corresponde ao Controle Negativo, no qual o anticorpo primário não foi adicionado. Os anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:2000, e todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, proveniente do kit ECL, diluído a 1:4000. A visualização foi realizada por quimioluminescência, e as imagens foram adquiridas com o equipamento L-Pix Chemi com exposição de 20 minutos em cada experimento.

A ausência de reconhecimento observada é biologicamente coerente com as diferenças estruturais entre fungos e bactérias. O envelope celular de *C. albicans* compreende membrana plasmática, espaço periplasmático, parede celular e uma camada fibrosa externa, desempenhando funções relacionadas à adesão, antigenicidade e secreção de enzimas hidrolíticas (Shepherd, 1987). Além disso, sua parede celular é composta predominantemente por manoproteínas e β -glucanos, com menor proporção de quitina, e apresenta organização dinâmica que varia conforme o estágio de crescimento e a morfologia celular (Hall; Gow, 2013; Shepherd, 1987). Em especial, a camada mais externa é enriquecida em manoproteínas, enquanto a quitina se localiza principalmente em regiões internas da parede (Shepherd, 1987). Esse arranjo difere substancialmente da organização típica das bactérias, nas quais o peptidoglicano ocupa papel estrutural central. Como os anticorpos testados neste trabalho foram produzidos contra epítomos bacterianos derivados de proteínas de *S. saprophyticus*, era biologicamente esperado que não apresentassem reatividade detectável frente a uma célula eucariótica com arquitetura superficial e composição de parede tão distintas.

Outro ponto importante é que a escolha de *C. albicans* como controle negativo agrega valor metodológico ao ensaio. Diferentemente de um controle negativo artificial ou pouco relacionado ao contexto clínico estudado, *C. albicans* é um microrganismo que pode estar presente em infecções do trato urinário, mas cuja estrutura celular é suficientemente diferente das bactérias uropatogênicas para funcionar como parâmetro de comparação negativa. Assim, a ausência de sinal frente a esse fungo fortalece a interpretação de que os anticorpos empregados apresentam reatividade preferencial frente a alvos bacterianos, ao menos nas condições aqui avaliadas.

Em conjunto, os resultados obtidos apoiam a utilização de *C. albicans* como possível controle negativo experimental em estudos subsequentes. Adicionalmente, mais do que um resultado simplesmente “ausente”, esse achado contribui para a validação biológica do ensaio, ao demonstrar que a quimioluminescência observada para as bactérias testadas possivelmente não decorre de uma reatividade indiscriminada, mas de um reconhecimento mais seletivo de alvos associados ao contexto bacteriano.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a capacidade de anticorpos policlonais, desenvolvidos a partir de epítomos derivados de proteínas associadas à parede celular de *S. saprophyticus*, em reconhecer células intactas de outras bactérias uropatogênicas de relevância clínica. Os resultados obtidos demonstraram que, embora tenham sido produzidos a partir de epítomos de *S. saprophyticus*, os anticorpos foram capazes de reconhecer também *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. variicola*, espécies frequentemente associadas à infecção do trato urinário.

Em conjunto com as análises *in silico*, esses achados sugerem que os epítomos utilizados para a produção dos anticorpos apresentam regiões conservadas entre diferentes bactérias uropatogênicas, o que pode explicar o reconhecimento cruzado observado experimentalmente. Esse resultado é relevante por indicar o potencial de utilização desses anticorpos como ferramenta imunológica para detecção bacteriana em infecções do trato urinário. Além disso, a ausência de reconhecimento de *C. albicans* reforça a especificidade dos anticorpos para alvos de origem bacteriana, contribuindo para a interpretação da seletividade do ensaio.

A avaliação experimental de *P. mirabilis* exigiu maior cautela interpretativa, pois a presença de sinal no controle negativo sugeriu possível interferência de *background* inespecífico nas condições analisadas. Ainda assim, esse achado foi relevante por evidenciar a necessidade de refinamento metodológico, visando melhor distinção entre sinal específico e inespecífico. De modo semelhante, a avaliação em urina demonstrou que o reconhecimento imunológico pode ser investigado em uma matriz biologicamente mais próxima do contexto clínico das infecções urinárias. Embora tenha sido observada interferência em um dos controles contendo urina, esse resultado não invalida o experimento, ao contrário, ressalta desafios técnicos importantes e reforça a necessidade de ajustes metodológicos adicionais para redução do sinal de fundo e aumento da especificidade do ensaio.

Adicionalmente, a titulação do anticorpo AE1 permitiu caracterizar sua faixa de resposta no ensaio de *On-Cell Western*, evidenciando redução progressiva do sinal quimioluminescente com o aumento da diluição do anticorpo. Esse resultado

contribuiu para a delimitação experimental da faixa de detecção do AE1 nas condições avaliadas e para a melhor compreensão do desempenho analítico do ensaio.

Em última análise, a técnica de *On-Cell Western* mostrou-se promissora para a detecção imunológica de bactérias uropatogênicas em células intactas. Apesar de ainda serem necessários ajustes metodológicos para ampliar a especificidade e reduzir interferências de *background*, os resultados obtidos sustentam o potencial dessa abordagem para futuras aplicações no desenvolvimento de métodos diagnósticos mais rápidos e acessíveis para infecções do trato urinário. Ademais, a estratégia aqui investigada poderá futuramente subsidiar a adaptação dos anticorpos para plataformas mais simples, incluindo testes rápidos baseados em membrana de nitrocelulose. Considerando a sensibilidade observada no reconhecimento imunológico, esses anticorpos também poderão ser explorados, em estudos futuros, em outras abordagens que demandem elevada sensibilidade analítica, como o monitoramento microbiológico de amostras e produtos submetidos a controle de esterilidade, bem como em investigações voltadas à detecção de bacteremia em matrizes clínicas mais complexas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como desdobramento deste estudo, espera-se ampliar a validação experimental dos anticorpos em um maior número de isolados e espécies bacterianas, a fim de fortalecer a análise da abrangência e da reprodutibilidade do reconhecimento imunológico observado. Também será importante aprofundar os ensaios em urina, buscando adaptar a estratégia experimental a condições mais próximas da realidade clínica das infecções do trato urinário.

Adicionalmente, os achados obtidos poderão subsidiar a adaptação desses anticorpos para métodos de detecção mais simples e acessíveis, como abordagens colorimétricas, que poderão representar alternativas potencialmente menos suscetíveis a variações analíticas observadas em sistemas quimioluminescentes, bem como para plataformas baseadas em membrana de nitrocelulose. Essas possibilidades podem favorecer o desenvolvimento futuro de ferramentas diagnósticas mais práticas para aplicação em microbiologia clínica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALHADI, Enas. Detection of virulence *iroN* gene in *Klebsiella pneumoniae* in urinary tract infections patients from Iraq. **Basrah Researches Sciences**, v. 50, n. 1, p. 9–9, 30 jun. 2024.

ALEGRIA-SCHAFFER, Alice; LODGE, Andrew; VATTEM, Krishna. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 573–599, 2009.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.

AMDEKAR, Sarika; SINGH, Vinod; SINGH, Desh Deepak. Probiotic Therapy: Immunomodulating Approach Toward Urinary Tract Infection. **Current Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 484, 7 set. 2011.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG). Urinary Tract Infections in Pregnant Individuals. **Obstetrics & Gynecology**, v. 142, n. 2, p. 435, ago. 2023.

ANTON, Corina-Ioana *et al.* Etiology and Risk Factors of Recurrent Urinary Tract Infections in Women in a Multidisciplinary Hospital in Romania. **Microorganisms**, v. 13, n. 3, p. 626, 10 mar. 2025.

ARMBRUSTER, Chelsie E.; MOBLEY, Harry L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 743–754, nov. 2012.

ARMBRUSTER, Chelsie E.; MOBLEY, Harry L. T.; PEARSON, Melanie M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, p. 10.1128/ecosalplus.ESP-0009–2017, 8 fev. 2018.

BARRIOS-CAMACHO, Humberto *et al.* Molecular epidemiology of *Klebsiella variicola* obtained from different sources. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10610, 23 jul. 2019.

BEHZADI, Payam; BEHZADI, Elham; RANJBAR, Reza. Urinary tract infections and *Candida albicans*. **Central European Journal of Urology**, v. 68, n. 1, p. 96–101, 2015.

BERMUDEZ, Tomas *et al.* Novel technologies for the diagnosis of urinary tract infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 63, n. 2, p. e00306-24, 6 jan. 2025.

BLAINEY, Paul; KRZYWINSKI, Martin; ALTMAN, Naomi. Points of significance: replication. **Nature Methods**, v. 11, n. 9, p. 879–880, set. 2014.

BLAST® Command Line Applications User Manual. [S.l.]: National Center for Biotechnology Information (US), 2008.

BLAST Scoring and Statistics. Training Material and Manuals. Disponível em: <https://www.nlm.nih.gov/ncbi/workshops/2023-08_BLAST_evol/blast_score.html>. Acesso em: 2 mar. 2026.

BONILLA, Diana L. *et al.* The Power of Reagent Titration in Flow Cytometry. **Cells**, v. 13, n. 20, p. 1677, 11 out. 2024.

BOTTINO, Carolina G. *et al.* Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 568, 3 dez. 2013.

BOUATRA, Souhaila *et al.* The Human Urine Metabolome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73076, 4 set. 2013.

BOURGEOIS, Ingrid *et al.* Characterization of AtIL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 290, n. 1, p. 105–113, 1 jan. 2009.

BOVEIA, Vince; SCHUTZ-GESCHWENDER, Amy. Quantitative Analysis of Signal Transduction with In-Cell Western Immunofluorescence Assays. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1314, p. 115–130, 2015.

BROCKMÖLLER, Sabrina *et al.* Recombinant cellular model system for human muscle-type nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 12\beta 1\delta\epsilon$. **Cell Stress & Chaperones**, v. 28, n. 6, p. 1013–1025, nov. 2023.

BUI, Huynh-Hoa *et al.* Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 361, 26 set. 2007.

CARRENO, Joseph J. *et al.* Longitudinal, Nationwide, Cohort Study to Assess Incidence, Outcomes, and Costs Associated With Complicated Urinary Tract Infection. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 11, p. ofz446, 1 nov. 2019.

CHARETTE, Steve J. *et al.* Protein quantification by chemiluminescent Western blotting: elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve. **Journal of Immunological Methods**, v. 353, n. 1–2, p. 148–150, 28 fev. 2010.

CHIU, May L. *et al.* Matrix Effects—A Challenge toward Automation of Molecular Analysis. **SLAS Technology**, Special Issue: Nanomaterials and Microfluidics for Automation. v. 15, n. 3, p. 233–242, 1 jun. 2010.

CHO, Sun Young; HUR, Mina. Advances in Automated Urinalysis Systems, Flow Cytometry and Digitized Microscopy. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 39, n. 1, p. 1, 13 set. 2018.

CLAEYS, Kimberly C. *et al.* Advances and Challenges in the Diagnosis and Treatment of Urinary Tract Infections: the Need for Diagnostic Stewardship. **Current Infectious Disease Reports**, v. 21, n. 4, p. 11, 5 mar. 2019.

COSTELLOE, Céire *et al.* Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 340, p. c2096, 18 maio 2010.

DA CUNDA, Paula *et al.* In house-development of a rapid immunochromatographic test for the detection of *Escherichia coli* in urine samples. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 56, n. 2, p. 140–146, 1 abr. 2024.

DANILO DE OLIVEIRA, Wellington *et al.* Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, p. 104642, 1 mar. 2021.

DAVENPORT, Michael *et al.* New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n. 5, p. 296–310, maio 2017.

DENAMUR, Erick *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37–54, jan. 2021.

DEVILLÉ, Walter LJM *et al.* The urine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy. **BMC Urology**, v. 4, n. 1, p. 4, 2 jun. 2004.

FAROOQ, Jeffrey *et al.* RNA Binding Motif 5 Gene Deletion Modulates Cell Signaling in a Sex-Dependent Manner but Not Hippocampal Cell Death. **Journal of Neurotrauma**, v. 39, n. 7–8, p. 577–589, 1 abr. 2022.

FARRELL, D. J. *et al.* A UK Multicentre Study of the Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Pathogens Causing Urinary Tract Infection. **Journal of Infection**, v. 46, n. 2, p. 94–100, fev. 2003.

FASSLER, Jan; COOPER, Peter. BLAST Glossary. *In: BLAST® Help [Internet]. [S.l.]: National Center for Biotechnology Information (US), 2011.*

FLORES-MIRELES, Ana L. *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, maio 2015.

FOURNIER, Claudia; BRONS, Stephan; TAUCHER-SCHOLZ, Gisela. Quantification of chemiluminescent signals using photon-sensitive films or a CCD camera. **BioTechniques**, v. 35, n. 2, p. 284–290, 1 ago. 2003.

FOXMAN, Betsy. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 1, p. 5–13, 8 jul. 2002.

FRANK, Steven A. Specificity and Cross-Reactivity. *In: Immunology and Evolution of Infectious Disease. [S.l.]: Princeton University Press, 2002.*

GALVÃO, Vivian Santos *et al.* PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* E *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IDENTIFICADOS EM INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, 1 out. 2023.

GATERMANN, S.; JOHN, J.; MARRE, R. Staphylococcus saprophyticus urease: characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection of rats. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 1, p. 110–116, jan. 1989.

GHASEMI, Asghar; ZAHEDIASL, Saleh. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 486–489, 2012.

GHOSHEH, Ghadeer O. *et al.* Development and validation of a parsimonious prediction model for positive urine cultures in outpatient visits. **PLOS Digital Health**, v. 2, n. 11, p. e0000306, 1 nov. 2023.

GOVINDARAJAN, Deenadayalan Karaiyagowder; KANDASWAMY, Kumaravel. Virulence factors of uropathogens and their role in host pathogen interactions. **The Cell Surface**, v. 8, p. 100075, 1 dez. 2022.

GREENBAUM, Shirley *et al.* Ecological dynamics of the vaginal microbiome in relation to health and disease. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 220, n. 4, p. 324–335, 1 abr. 2019.

HAIDER, Ali *et al.* The Current Level of MALDI-TOF MS Applications in the Detection of Microorganisms: A Short Review of Benefits and Limitations. **Microbiology Research**, v. 14, n. 1, p. 80–90, 19 jan. 2023.

HALL, Rebecca A.; GOW, Neil A. R. Mannosylation in Candida albicans: role in cell wall function and immune recognition. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1147–1161, dez. 2013.

HATFIELD, Kelly M. *et al.* Assessing Variability in Hospital-Level Mortality among U.S. Medicare Beneficiaries with Hospitalizations for Severe Sepsis and Septic Shock. **Critical care medicine**, v. 46, n. 11, p. 1753–1760, nov. 2018.

HENIKOFF, S.; HENIKOFF, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 22, p. 10915–10919, 15 nov. 1992.

HINATA, Nobuyuki *et al.* Quantitative detection of Escherichia coli from urine of patients with bacteriuria by real-time PCR. **Molecular Diagnosis**, v. 8, n. 3, p. 179–184, 1 set. 2004.

HOOTON, Thomas M. Uncomplicated Urinary Tract Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 11, p. 1028–1037, 15 mar. 2012.

HUANG, Rong *et al.* Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of urinary tract infection in patients undergoing cutaneous ureterostomy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 991011, 27 jan. 2023.

JANES, Kevin A. An Analysis of Critical Factors for Quantitative Immunoblotting. **Science signaling**, v. 8, n. 371, p. rs2, 7 abr. 2015.

KADLEC, Meichei Wang *et al.* A Cell Phone–Based Microphotometric System for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing. **Journal of Laboratory Automation**, v. 19, n. 3, p. 258–266, 1 jun. 2014.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.

KASS, E. H. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract; with observations on the use of methionine as a urinary antiseptic. **A.M.A. Archives of Internal Medicine**, v. 100, n. 5, p. 709–714, nov. 1957.

KAYE, Keith S. *et al.* Prevalence, regional distribution, and trends of antimicrobial resistance among female outpatients with urine *Klebsiella* spp. isolates: a multicenter evaluation in the United States between 2011 and 2019. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 13, n. 1, p. 21, 14 fev. 2024.

KERFELD, Cheryl A.; SCOTT, Kathleen M. Using BLAST to Teach “E-value-tionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, n. 2, p. e1001014, 1 fev. 2011.

KIM, Hae-Young. Analysis of variance (ANOVA) comparing means of more than two groups. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 39, n. 1, p. 74–77, fev. 2014.

KLEIN, Roger D.; HULTGREN, Scott J. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. **Nature reviews. Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 211–226, abr. 2020.

KLIMKA, Alexander *et al.* Epitope-specific immunity against *Staphylococcus aureus* coproporphyrinogen III oxidase. **NPJ Vaccines**, v. 6, p. 11, 18 jan. 2021.

KLINE, Kimberly A.; LEWIS, Amanda L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec.UTI-0012–2012, abr. 2016.

KOLLA, Harish Babu; MAKAM, Shivakiran Satyanarayan; REDDY, Prakash Narayana. Mapping of conserved immunodominant epitope peptides in the outer membrane porin (Omp) L of prominent Enterobacteriaceae pathogens associated with gastrointestinal infections. **Journal of Genetic Engineering & Biotechnology**, v. 21, p. 146, 28 nov. 2023.

KORSTEN, Koos *et al.* Using the Sysmex UF-4000 urine flow cytometer for rapid diagnosis of urinary tract infection in the clinical microbiological laboratory. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 38, n. 5, p. e25004, 7 mar. 2024.

KUIL, S. D. *et al.* “A false sense of confidence” The perceived role of inflammatory point-of-care testing in managing urinary tract infections in Dutch nursing homes: a qualitative study. **BMC Geriatrics**, v. 20, n. 1, p. 450, 4 nov. 2020.

KUMAR, Nishant *et al.* Multi-perspectives and challenges in identifying B-cell epitopes. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 32, n. 11, p. e4785, 1 nov. 2023.

LAWATI, Hawra Al; BLAIR, Barbra M.; LARNARD, Jeffrey. Urinary Tract Infections: Core Curriculum 2024. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 83, n. 1, p. 90–100, 1 jan. 2024.

LEE, Dong Sup; LEE, Seung-Ju; CHOE, Hyun-Sop. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 7656752, 26 set. 2018.

LI, Xuhui *et al.* Global and Regional Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in Urinary Tract Infections in 2019. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 10, p. 2817, 17 maio 2022.

LLOR, Carl *et al.* Diagnosing probable urinary tract infections in nursing home residents without indwelling catheters: a narrative review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 30, n. 12, p. 1523–1528, 1 dez. 2024.

LOURENÇÃO, Luciano Garcia *et al.* [Original em português] O impacto das infecções urinárias recorrentes na qualidade de vida de mulheres em atendimento ambulatorial no Brasil. **Población y Salud en Mesoamérica**, 1 jan. 2024.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 1 mar. 2012.

MALIK, Rena D.; WU, Yuefeng Rose; ZIMMERN, Philippe E. Definition of Recurrent Urinary Tract Infections in Women: Which One to Adopt? **Female Pelvic Medicine & Reconstructive Surgery**, v. 24, n. 6, p. 424–429, 2018.

MAMBATTA, Anith Kumar *et al.* Reliability of dipstick assay in predicting urinary tract infection. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 4, n. 2, p. 265, jun. 2015.

MANCUSO, Giuseppe *et al.* Urinary Tract Infections: The Current Scenario and Future Prospects. **Pathogens**, v. 12, n. 4, p. 623, 20 abr. 2023.

MANCUSO, Giuseppe *et al.* Novel Antimicrobial Approaches to Combat Bacterial Biofilms Associated with Urinary Tract Infections. **Antibiotics**, v. 13, n. 2, p. 154, 4 fev. 2024.

MARSHALL, Katherine; HALE, Deborah. Urinary Tract Infections. **Home Healthcare Now**, v. 35, n. 8, p. 448, set. 2017.

MARTÍN-GUTIÉRREZ, Guillermo *et al.* FlowUTI: An interactive web-application for optimizing the use of flow cytometry as a screening tool in urinary tract infections. **PLOS ONE**, v. 17, n. 11, p. e0277340, 8 nov. 2022.

MÉCHIN, M. C.; ROUSSET, E.; GIRARDEAU, J. P. Identification of surface-exposed linear B-cell epitopes of the nonfimbrial adhesin CS31A of *Escherichia coli* by using overlapping peptides and antipeptide antibodies. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3555–3564, set. 1996.

MITCHELL, Spencer J. *et al.* Building blocks and blueprints for bacterial autolysins. **PLOS Computational Biology**, v. 17, n. 4, p. e1008889, 1 abr. 2021.

MOBLEY, Harry L. T.; BELAS, Robert. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 280–284, 1 jul. 1995.

MOURA, Aline Coelho *et al.* Perfil epidemiológico das internações por cistite no Brasil entre 2018 e 2022. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 3, p. e70646–e70646, 20 jun. 2024.

MULVEY, Matthew A. *et al.* Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 282, n. 5393, p. 1494–1497, 20 nov. 1998.

MYSOREKAR, Indira U.; HULTGREN, Scott J. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 38, p. 14170–14175, 19 set. 2006.

NELSON, David L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 8. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2022.

NEUENSCHWANDER, Felix R.; GROSS, Birgit; SCHUBERT, Sören. Rapid Antibiotic Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Directly from Urine Samples of UTI Patients Using MALDI-TOF MS. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 6, p. 1042, 12 jun. 2023.

NUCCI, Amandine *et al.* Emergence of novel non-aggregative variants under negative frequency-dependent selection in *Klebsiella variicola*. **microLife**, v. 4, p. uqad038, 12 set. 2023.

OCHOŃSKA, Dorota; BRZYCHCZY-WŁOCH, Monika. *Klebsiella Pneumoniae* – Taxonomy, Occurrence, Identification, Virulence Factors and Pathogenicity. **Advancements of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 157–175, 29 set. 2024.

OLIVEIRA, Andrea Santana de *et al.* Immunoproteomic and immunoinformatic approaches identify secreted antigens and epitopes from *Staphylococcus saprophyticus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 181, p. 106171, 1 ago. 2023.

ÖZTÜRK, Recep; MURT, Ahmet. Epidemiology of urological infections: a global burden. **World Journal of Urology**, v. 38, n. 11, p. 2669–2679, 1 nov. 2020.

PALANIAPPAN, Raghavan U. M. *et al.* Differentiation of *Escherichia coli* Pathotypes by Oligonucleotide Spotted Array. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1495–1501, abr. 2006.

PARVIZPOUR, Sepideh *et al.* Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 6, p. 1034–1042, 1 jun. 2020.

PATRONOV, Atanas; DOYTCHINOVA, Irini. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. **Open Biology**, v. 3, n. 1, p. 120139, 8 jan. 2013.

PENG, Hu *et al.* Secreted Cyclophilin A, a Peptidylprolyl cis-trans Isomerase, Mediates Matrix Assembly of Hensin, a Protein Implicated in Epithelial Differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 10, p. 6465–6475, 6 mar. 2009.

PERI, Anna Maria *et al.* New Microbiological Techniques for the Diagnosis of Bacterial Infections and Sepsis in ICU Including Point of Care. **Current Infectious Disease Reports**, v. 23, n. 8, p. 12, 2021.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, out. 1998.

POTTER, Robert F. *et al.* Population Structure, Antibiotic Resistance, and Uropathogenicity of Klebsiella variicola. **mBio**, v. 9, n. 6, p. e02481-18, 18 dez. 2018.

RAMAIAH, Kavi Bharathi *et al.* “Urinary tract infection: Conventional testing to developing Technologies”. **Clinica Chimica Acta**, v. 565, p. 119979, 15 jan. 2025.

RANJBARIAN, Parivash *et al.* Finding epitopes of Klebsiella pneumoniae outer membrane protein-K17 (OMP-K17) and introducing a 25-mer peptide of it as a vaccine candidate. **Biologia**, p. 1–11, 14 mar. 2023.

RAZ, Raul; COLODNER, Raul; KUNIN, Calvin M. Who Are You—Staphylococcus saprophyticus? **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 6, p. 896–898, 15 mar. 2005.

RING, Brooke *et al.* Genetic Manipulation of Klebsiella pneumoniae. **Current protocols**, v. 3, n. 10, p. e912, out. 2023.

ROGERS, Ariel T. *et al.* Bacterial Growth Curve Measurements with a Multimode Microplate Reader. **Bio-protocol**, v. 12, n. 9, p. e4410, 5 maio 2022.

ROSSI, Paolo *et al.* Structural Elucidation of the Cys-His-Glu-Asn Proteolytic Relay in the Secreted CHAP Domain Enzyme from the Human Pathogen Staphylococcus saprophyticus. **Proteins**, v. 74, n. 2, p. 515–519, 1 fev. 2009.

SANCHEZ-TRINCADO, Jose L.; GOMEZ-PEROSANZ, Marta; RECHE, Pedro A. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 2680160, 2017.

SCHROLL, Casper *et al.* Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 179, 23 jun. 2010.

SERAPIDE, Francesca *et al.* Impact of Multiplex PCR on Diagnosis of Bacterial and Fungal Infections and Choice of Appropriate Antimicrobial Therapy. **Diagnostics**, v. 15, n. 8, p. 1044, jan. 2025.

SEZONOV, Guennadi; JOSELEAU-PETIT, Danièle; D'ARI, Richard. Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746–8749, dez. 2007.

SHAH, Chhaya *et al.* Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiology**, v. 19, p. 204, 2 set. 2019.

SHEPHERD, Maxwell G. Cell Envelope of *Candida Albicans*. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 7–25, 1 jan. 1987.

SHIHAN, Mahbubul H. *et al.* A simple method for quantitating confocal fluorescent images. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 25, p. 100916, 1 fev. 2021.

SILVA, Guilherme. **Caracterização funcional de epítomos conservados em bactérias uropatogênicas com potencial para uso diagnóstico e terapêutico**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 31 jan. 2025.

SIN, Mandy L. Y. *et al.* A Universal Electrode Approach for Automated Electrochemical Molecular Analyses. **Journal of microelectromechanical systems : a joint IEEE and ASME publication on microstructures, microactuators, microsensors, and microsystems**, v. 22, n. 5, p. 1126–1132, out. 2013.

STAPLETON, Ann E. *et al.* Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial of a *Lactobacillus crispatus* Probiotic Given Intravaginally for Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 10, p. 1212–1217, 15 maio 2011.

STAPLETON, Ann E. *et al.* Performance of a New Rapid Immunoassay Test Kit for Point-of-Care Diagnosis of Significant Bacteriuria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2805–2809, set. 2015.

STEIGER, Samantha N.; COMITO, Rachel R.; NICOLAU, David P. Clinical and economic implications of urinary tract infections. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v. 17, n. 4, p. 377–383, ago. 2017.

STORME, Oscar *et al.* Risk factors and predisposing conditions for urinary tract infection. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 11, p. 1756287218814382, 2 maio 2019.

SUJITH, Swathi; SOLOMON, Adline Princy; RAYAPPAN, John Bosco Balaguru. Comprehensive insights into UTIs: from pathophysiology to precision diagnosis and management. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, 24 set. 2024.

SUN, Jiayi; CHENG, Kai; XIE, Yanyun. Urinary Tract Infections Detection with Molecular Biomarkers. **Biomolecules**, v. 14, n. 12, p. 1540, 30 nov. 2024.

SUN, Pingping *et al.* Advances in In-silico B-cell Epitope Prediction. <http://www.eurekaselect.com>, v. 19, n. 2, p. 105–115, 2019.

TATE, Jill; WARD, Greg. Interferences in Immunoassay. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 25, n. 2, p. 105–120, maio 2004.

TAYLOR, Sean C. *et al.* A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. **Molecular Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 217–226, 2013.

TAYLOR, Sean C.; POSCH, Anton. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 361590, 2014.

TAYLOR, Timothy P. *et al.* Overcoming the Effects of Matrix Interference in the Measurement of Urine Protein Analytes. **Biomarker Insights**, v. 7, p. 1–8, 1 fev. 2012.

TIMM, Morgan R.; RUSSELL, Seongmi K.; HULTGREN, Scott J. Urinary tract infections: pathogenesis, host susceptibility and emerging therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 72–86, fev. 2025.

TOHL, Damian *et al.* Point-of-care image-based quantitative urinalysis with commercial reagent strips: Design and clinical evaluation. **Methods**, v. 224, p. 63–70, 1 abr. 2024.

TRAN, Anthony *et al.* Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, 20 maio 2015.

VASUDEVAN, Ranganathan. Urinary Tract Infection: An Overview of the Infection and the Associated Risk Factors. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 1, n. 2, 15 maio 2014.

VOLLMER, Waldemar *et al.* Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 259–286, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. Genebra, Suíça: World Health Organization, 2024. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>>. Acesso em: 5 fev. 2025.

YANG, Songlin *et al.* Point-of-Care Urinary Tract Infection (UTI) Diagnosis Enhanced by Nanostructured Biosensors: Review Paper. **Advanced Sensor Research**, v. 3, n. 10, p. 2400051, 2024.

YANG, Xiaorong *et al.* Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 888205, 27 jul. 2022.

YELIN, Idan *et al.* Personal clinical history predicts antibiotic resistance of urinary tract infections. **Nature Medicine**, v. 25, n. 7, p. 1143–1152, jul. 2019.

ZHAO, Meng *et al.* Comparison of polymerase chain reaction and next-generation sequencing with conventional urine culture for the diagnosis of urinary tract infections: A meta-analysis. **Open Medicine**, v. 19, n. 1, p. 20240921, 28 mar. 2024.

ZHOU, Jiahuan *et al.* A Promising Tool in Serological Diagnosis: Current Research Progress of Antigenic Epitopes in Infectious Diseases. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1095, out. 2022.

ZILBERBERG, Marya D. *et al.* Descriptive Epidemiology and Outcomes of Hospitalizations With Complicated Urinary Tract Infections in the United States, 2018. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. ofab591, 1 jan. 2022.

ZOLL, Sebastian *et al.* Structural Basis of Cell Wall Cleavage by a Staphylococcal Autolysin. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000807, 12 mar. 2010.

ZORC, Joseph J.; KIDDOO, Darcie A.; SHAW, Kathy N. Diagnosis and Management of Pediatric Urinary Tract Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 417–422, abr. 2005.