

MARCELO ANANIAS

**MÉTODOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES NO ESTUDO DE
FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS POR HEMOCULTURA DE PACIENTES COM
SEPTICEMIA**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pós-Graduação do
Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular, Área de Concentração Microbiologia.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Marcelo Ananias

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

Campinas

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

An14m	<p>Ananias, Marcelo</p> <p>Métodos biológicos e moleculares no estudo de fatores de virulência em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas por hemocultura de pacientes com septicemia / Marcelo Ananias. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientador: Tomomasa Yano. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Escherichia coli</i>. 2. Humanos. 3. Septicemia. 4. Sepse. 5. Fatores de virulência. 5. ExPEC. I. Yano, Tomomasa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(scs/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Biologicals and moleculars methods in the study of virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated by blood culture of patients with septicaemia.

Palavras-chave em inglês: *Escherichia coli*; Humans; Septicaemia; Sepsis; Virulence factors; ExPEC.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Tomomasa Yano, Marcelo Brocchi, Angélica Zaninelli Schreiber.

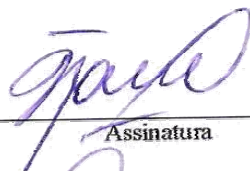
Data da defesa: 28/08/2006.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

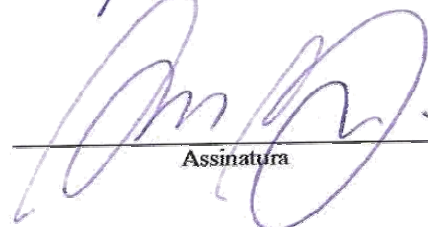
Campinas, 28 de agosto de 2006.

BANCA EXAMINADORA

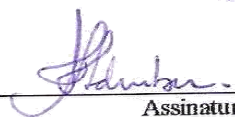
Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Angélica Zaninelli Schreiber


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Gleise V. Carbonell

Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silva

Assinatura

*“Conheço as tuas obras: não és nem frio nem quente. Oxalá fosses frio ou quente!
Mas, como és morno, nem frio e nem quente, vou vomitar-te.”.*
Apocalipse 3, 15-16.

*Dedico este trabalho aos
meus pais, pelo exemplo que
representam, pelo incentivo
que me deram e pelo amor
compartilhado durante toda
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida e pela sua imensa bondade, permitindo-me a conquista de tantas coisas.

Aos meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram e principalmente pelo amor que me deram.

Agradeço enormemente ao meu orientador, Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela excelente orientação, por toda confiança e apoio e pela grande pessoa que é. Ao senhor, toda a minha admiração.

A Profa. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li, da Faculdade de Ciências Médicas, pela generosidade, compreensão e conselhos.

As Profas. Dras. Angélica Zaninelli Schreiber e Maria Silvia Vicari Gatti, pelos seus valiosos ensinamentos na ocasião da pré-banca.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pelas sugestões no exame de qualificação. Agradeço a participação como membro da Banca Examinadora, juntamente com a Profa. Angélica.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela minha iniciação científica, por permitir o uso do Laboratório de Antígenos Bacterianos II e por fornecer os anti-soros para o ensaio de sorotipagem.

Aos amigos do laboratório, Daniela, Luciano, Jacqueline, Ana Carolina, Lucinha, Daniel, Anne, Ana Paula, Cláudio, Stéphanie, Suzana e Fernanda.

À Simone e Luciana, amigas do Laboratório de Endocrinologia Pediátrica, que sempre foram muito solícitas e prestativas, além de grandes amigas.

Aos técnicos, Paula, Ana Lúcia e Erivaldo por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Stella, pela sua simpatia, amizade, assessoramento técnico, ensinamentos e exímias sugestões. Imensamente, muito obrigado.

Aos docentes, amigos e colegas do departamento de Microbiologia e Imunologia pela convivência agradável.

À Universidade Estadual de Campinas, por me capacitar durante a graduação e agora na finalização do mestrado.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1. <i>Escherichia coli</i> patogênica extra-intestinal (ExPEC)	1
2. Septicemia	5
II. OBJETIVOS	9
1. Objetivos Específicos	9
III. MATERIAIS E MÉTODOS	10
1. Amostras Bacterianas	10
2. Métodos Biológicos	10
2.1. Determinação do sorogrupo O	10
2.2. Teste de hemolisina	11
2.3. Teste de protease	11
2.4. Teste de lecitinase	11
2.5. Letalidade em camundongos	12
3. Método molecular (caracterização genotípica)	13
3.1. Preparação do DNA bacteriano	13
3.2. Iniciadores, produto amplificado e temperatura de anelamento	13
3.3. Reação em Cadeia da Polimerase	13
3.4. Eletroforese em gel de agarose	13
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
1. Métodos biológicos	16
1.1. Sorogrupagem: antígeno O	16
1.2. Teste de hemolisina	19
1.3. Teste de protease	20
1.4. Teste de lecitinase	20
1.5. Letalidade em camundongos	21
2. Caracterização genotípica	22
V. CONCLUSÕES	29
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Gráficos:

Gráfico 1. Percentagem de genes associados a fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de humanos septicêmicos.....22

Gráfico 2. Distribuição dos alelos da adesina fimbrial P em amostras de *Escherichia coli* isoladas de septicemia em humanos.....25

Gráfico 3. Mecanismos de captação de ferro em amostras de *Escherichia coli* isoladas de humanos septicêmicos.....26

Quadros:

Quadro 1. Letalidade em camundongos: categorias e respectiva amostra representante.....12

Quadro 2. Iniciadores, produto amplificado e temperatura de anelamento15

Quadro 3. Letalidade em camundongos: resultados.....21

Tabelas:

Tabela 1. Percentagem das amostras de *Escherichia coli* distribuídas entre os sorogrupos O encontrados.....16

Tabela 2. Associação entre diversos patotipos de *E. coli* e sorogrupos O para 13,7% das amostras de *E. coli* isoladas de septicemia em humanos.....17

Tabela 3. Associação entre diversos patotipos de <i>E. coli</i> e sorogrupos O para 52,1% das amostras de <i>E. coli</i> isoladas de pacientes septicêmicos.....	18
Tabela 4. Sorogrupos O e características genotípicas das 73 amostras de <i>E. coli</i> isoladas de pacientes septicêmicos.....	23
Tabela 5. Associação numérica e em percentual entre os genes de FV pesquisados nas 73 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de pacientes septicêmicos.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

Português

- APEC: *Escherichia coli* Patogênica Aviária
- BHI: Infusão de Cérebro e Coração
- CNF: Fator Necrosante Citotóxico
- EaggEC/EAEC: *Escherichia coli* Enteroagregativa
- EPEC: *Escherichia coli* Enteropatogênica
- ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigênica
- ExPEC: *Escherichia coli* Patogênica Extra-intestinal
- FV: Fatores de Virulência
- Hly: Hemolisina
- MENEC: *Escherichia coli* associada à Meningite Neonatal
- MNEC: *Escherichia coli* associada à Meningite/sepse
- PAIs: Ilhas Associadas à Patogenicidade
- PBS: Tampão Salina Fosfato
- PCR: Reação da Polimerase em Cadeia
- SAT: Toxina Autotransportadora Secretada
- SEPEC: *Escherichia coli* associada à Seps
- TSB: Caldo Caseína de Soja
- UPEC: *Escherichia coli* Uropatogênica
- ITU: Infecções do Trato Urinário
- UTIs: Unidades de Tratamento Intensivo
- VTEC: *Escherichia coli* produtora de Vero citotoxina

Inglês

- APEC: Avian Pathogenic *Escherichia coli*
- BHI: Brain Heart Infusion
- CNF: Cytotoxic Necrotizing Factor
- EaggEC/EAEC: Enteroaggregative *Escherichia coli*
- EPEC: Enteropathogenic *Escherichia coli*

- ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli*
- ExPEC: Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*
- Hly: Hemolysin
- MENEC: Meningitis Neonatal *Escherichia coli*
- MNEC: Meningitis/sepsis-associated *Escherichia coli*
- PAIs: Pathogenicity-associated Islands
- PBS: Phosphate-buffered saline
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- SAT: Secreted Autotransporter Toxin
- SEPEC: Sepsis-associated *Escherichia coli*
- TSB: Tryptic Soy Broth
- UPEC: Uropathogenic *Escherichia coli*
- VTEC: Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*

RESUMO

A patogenicidade de *Escherichia coli* em infecções extra-intestinais (ExPEC) depende das propriedades de virulência bacterianas. Estas, geneticamente, distribuem-se por diversas ilhas associadas a patogenicidade – blocos gênicos contíguos – responsáveis por expressar fatores que permitem às bactérias colonizarem, sobreviverem e assim, agredirem a integridade do hospedeiro. Para setenta e três (73) amostras de *E. coli* oriundas de pacientes septicêmicos isoladas por hemocultura foram detectadas a sorogrupagem (antígeno O), produção de hemolisinas, produção de enzimas e letalidade em camundongos, assim como o estudo molecular pela PCR de genes dos principais FV relacionados a ExPEC: adesinas – fímbria tipo 1 (*fimH*), fímbria S (*sfaD/E*) e fímbria P (*papC*), além dos alelos 1, 2 e 3 da adesina fimbrial P (*papG*), adesina afimbrial (*afaB/C*); cápsula K1/K5 (*kpsMTII*); sideróforos - aerobactina (*iucD*), yersiniabactina (*fyuA*) e salmoquelina (*iroN*); toxinas – hemolisina (*hlyA*), fator necrozante citotóxico do tipo 1 (*cnfI*) e toxina autotransportadora secretada (*sat*); miscelâneos – invasão do endotélio microvascular cerebral (*ibeA*), resistência sérica (*traT*), colicina V (*cvaC*) e proteína uropatogênica específica (*usp*). Nenhuma amostra demonstrou atividade proteolítica. A produção de hemolisina foi detectada em 20,5% das amostras. Os sorogrupos O associados a UPEC prevaleceram em 52,1% das amostras contra 13,7% de outros sorotipos. Rugosas e não-tipáveis totalizaram 34,2%. Os resultados da PCR identificaram prevalência acima de 70% para os genes *fimH*, *fyuA*, *kpsMTII* e *iucD*. Entre 30% e 70% estiveram prevalentes os genes *papC* e *papG*, *sat*, *iroN*, *usp* e *traT*. Os genes *sfaD/E*, *hlyA*, *cnfI*, *cvaC*, *ibeA* e *afaB/C* estiveram presentes em no máximo 20% das amostras. O alelo de maior incidência para *papG* foi o 2; contudo, o alelo 3 apresentou maiores índices de associação com os outros fatores de virulência e o alelo 1 não foi detectado. A alta prevalência de amostras encapsuladas (74,0%) e hábeis em seqüestrar ferro (75,3%) condiz com a origem septicêmicas das amostras em estudo, que necessariamente devem driblar o sistema imunológico do hospedeiro e seqüestrar ferro. Todavia, os genes com baixa prevalência parecem desempenhar significativa função na ausência dos genes com maior prevalência neste estudo.

ABSTRACT

The pathogenicity of *Escherichia coli* in extraintestinal infections (ExPEC) depends to virulence properties bacterial. This, genetically, spread by several pathogenicity associated islands – genic blocks contiguous – responsible to express factors that allow to bacteria colonize, survive and thus, hurt the host integrity. Seventy three strains of *E. coli* isolated from septicemic patients by means of hemoculture, it was detected antigen O sorogroup, production of hemolysins, enzymes e mouse lethality, plus the molecular study by PCR of the main genes associated of virulence factors in ExPEC: adhesins – type 1 fimbriae (*fimH*), S fimbriae (*sfaD/E*) and fimbriae P (*papC*), and the alleles 1, 2 and 3 of adhesin P fimbrial, afimbrial adhesin (*afaB/C*); capsule K1/K5 (*kpsMTII*); siderophores – aerobactin (*iucD*), yersiniabactin (*fyuA*) and salmochelin (*ironN*); toxins – hemolysin (*hlyA*), necrotizing cytotoxic factor type 1 (*cnf1*) and toxin autotransporter secreted (*sat*); miscellaneous – brain microvascular endothelial cells invasion (*ibeA*), seric resistance (*traT*), colicin V (*cvaC*) and specific uropathogenic protein (*usp*). No strain showed proteolytic activity. Hemolysin production was detected in 20,5% of strains. The O sorogroups associated to UPEC prevalent in 52,1% of strains against 13,7% of others sorogroups. Wrinkled and no-type totalized 34,2%. The results of the PCR identified prevalence above 70% for the genes *fimH*, *fyuA*, *kpsMTII* and *iucD*. Between 30-70% are prevalent the genes *papC* and *papG*, *sat*, *iron*, *usp* and *traT*. The genes *sfaD/E*, *hlyA*, *cnf1*, *cvaC*, *ibeA* and *afaB/C* have been presents in the maxim 10% of strains. The allele with higher prevalence to *papG* was 2; but, the allele 3 presented higher numbers of association with others virulence factors. The high prevalence of encapsulated strains (74,0%) and able to uptake iron (75,3%) is according to the origin septicemic of strains studied, that necessarily may escape of the immunological system of host and uptake iron. However, the genes with low prevalence seems to display an important function in the lack of the genes prevalent in this study.

I. INTRODUÇÃO

1. *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal

A bactéria *Escherichia coli* foi primeiramente descrita por um pediatra bavário (alemão), Theodor Escherich, no final do século XIX. Em estudos pioneiros sequenciais da flora intestinal de crianças, Dr. Escherich descreveu um habitante microbial regular de indivíduos saudáveis que ele nomeou com colaboradores de *Bacterium coli*, que foi finalmente renomeado em sua homenagem.

A bactéria bacilar Gram-negativa *E. coli* (família *Enterobacteriaceae*) é constituinte da microbiota intestinal de animais endotérmicos (aves e mamíferos). Em termos de sua importância biológica, podemos genericamente categorizá-la como: (1) *E. coli* comensal (colonizadores intestinais não-patogênicos), (2) *E. coli* patogênica intestinal (cepas diarreiogênicas), e (3) *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) (Russo e Johnson, 2000).

Apesar desta espécie ter contribuído significativamente no desenvolvimento da biologia molecular por servir como um modelo pioneiro de organismo no qual aspectos fundamentais da regulação gênica foram elucidados e também por ter se constituído num proveitoso hospedeiro para clonagem (Sambrook et al., 1989), foram os efeitos prejudiciais de *E. coli* que nortearam a maioria dos estudos sobre essa bactéria. A primeira evidência de que apenas certas cepas de *E. coli* deveriam estar associadas com doenças, enquanto outras cepas não estavam, veio com o desenvolvimento de métodos de sorotipagem durante as décadas de 1930 e 1940, culminando no método Kauffman - que com modificações - ainda é usado atualmente. Em 1945, outro pediatra, John Bray, foi o primeiro a definir um sorogrupo de cepas de *E. coli* que estavam associadas com uma doença em particular: a diarreia infantil. Este subgrupo, hoje conhecido como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), foi definido e diagnosticado com base na sorotipagem até o final dos anos 80. Subgrupos adicionais de *E. coli* associados com doenças intestinais foram descritos nos anos 60 e chamados *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).

Existem ao menos seis bem caracterizadas classes ou patotipos de *E. coli* que podem causar doença intestinal em humanos (Kaper et al., 2004). EPEC estão primariamente associadas com diarreia infantil em países subdesenvolvidos e produzem uma característica histopatológica conhecida como “attaching and effacing” (AE) sobre as células epiteliais intestinais. Um patotipo intimamente relacionado é a *E. coli* enteroemorrágica (EHEC) que também causa histopatologia por AE, mas adicionalmente produz uma potente citotoxina - a

toxina Shiga (Stx) - que aumenta o espectro da doença incluindo diarreia, disenteria e a síndrome urêmica hemolítica (HUS), uma doença renal potencialmente fatal. EHEC são um subgrupo de uma categoria maior chamada *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que produz Stx, mas podem não ter os genes que codificam a histopatologia AE. Mais de 200 sorotipos de *E. coli* mostraram-se produtoras de Stx, porém a maioria deles provavelmente não se torna potencialmente patogênico devido à ausência de outros fatores de virulência. ETEC são a maior causa de Diarreia dos Viajantes em indivíduos de países industrializados que viajam para países subdesenvolvidos e são uma importante causa de diarreia infantil. ETEC produz ST e/ou a enterotoxina termolábil (LT) tão bem quanto uma variedade de fatores de colonização intestinais. EIEC são essencialmente *Shigella*, mais similares a *Shigella flexneri* ou *Shigella sonnei* uma vez que estas não produzem Stx como *Shigella dysenteriae*. *E. coli* e *Shigella* são taxonomicamente indistinguíveis ao nível de espécie e EIEC/*Shigella* causam diarreia e disenteria através de um mecanismo patogênico complexo que se inicia com a invasão epitelial e se espalha para as células adjacentes. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foram inicialmente descobertas com base em seu padrão de aderência agregativa sobre cultura de células epiteliais, e desde então se descobriu que são produtoras de inúmeras toxinas. EAEC são progressivamente reconhecidas como a causa de diarreia persistente em crianças e adultos tanto em países em desenvolvimento quanto nos industrializados e foram causa de vários grandes surtos em diversos países. *E. coli* difusamente aderente (DAEC) foram também inicialmente definidas com base em seu padrão de aderência difusa em cultura celular epitelial e foram implicadas como causa de diarreia em crianças mais velhas por estudos diversos. DAEC ativam a cascata de transdução de sinal celular epitelial que pode arruinar a função de enzimas, dentre outros danos (Kaper et al., 2004).

E. coli são também importante causa de infecções extra-intestinais. Um patotipo conhecido como *E. coli* uropatogênica (UPEC) é a maior causa de infecções do trato urinário (ITU) adquiridas na comunidade. Múltiplas adesinas e toxinas foram descritas para UPEC e estes diferentes fatores de virulência (VF) são encontrados em porcentagens diversas entre os diferentes subgrupos de UPEC. Outro patotipo extra-intestinal, a *E. coli* associada à meningite/seps (MNEC), é a mais comum causa de meningite por Gram-negativa em neonatos. MNEC desloca-se do sangue para o sistema nervoso central através de um processo invasivo que resulta na inflamação das meninges (Kaper et al., 2004).

E. coli não só causam doenças em humanos, como também em animais. Por exemplo, ETEC são uma importante causa de diarreia em uma variedade de espécies animais através de

mecanismos patogênicos envolvendo ST, LT e fatores de colonização que podem, em alguns casos, estar associados a uma determinada espécie animal. *E. coli* patogênica aviária (APEC) causam infecções do trato respiratório em aves domésticas. As *E. coli* necrotóxicas (NTEC) produzem fatores necrozantes citotóxicos (CNF1, CNF2) e foram associadas com doenças tanto em animais quanto em humanos. Outros grupos de cepas de *E. coli* foram implicados como patógenos potenciais, mas estão pobremente caracterizadas atualmente. Um dos mais intrigantes desses potenciais patótipos é um grupo de cepas de *E. coli* que estão associadas com a doença de Crohn e tem sido chamadas de *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) (Kaper et al., 2004).

E. coli causa doença através de uma extraordinária gama de VF que podem afetar uma ampla variedade de importantes processos celulares do hospedeiro, incluindo síntese protéica, transdução de sinal, funcionalidade do citoesqueleto, divisão celular, secreção iônica, transcrição, apoptose, e função mitocondrial (revisto em Kapper et al., 2004). As toxinas e proteínas efetoras que deflagram estes processos estão acompanhadas por numerosos fatores de colonização oportunos que permitem à bactéria aderir e/ou invadir células do hospedeiro. Por exemplo, mais de 20 diferentes fatores de colonização foram descritos para uma única cepa humana de ETEC. Os inúmeros fatores de virulência que distinguem *E. coli* patogênica de não-patogênica estão freqüentemente codificados em elementos genéticos móveis tais como plasmídios, transposons, bacteriófagos, e ilhas de patogenicidade. Estas, inicialmente descritas por Hacker e colegas em Würzburg, foram primeiramente caracterizadas em *E. coli* patogênicas e subsequenteiramente reconhecidas como estando presentes em muitas outras bactérias patogênicas. A ampla variedade de fatores de virulência que são freqüentemente codificadas por elementos genéticos móveis permite inumeráveis combinações de fatores de virulência em diferentes cepas de *E. coli*.

Assim, Russo e Johnson, em 2000, propuseram que as amostras de *E. coli* associadas às infecções extra-intestinais - que causam principalmente infecções urinárias, meningites e sepse - fossem coletivamente denominadas como ExPEC (*Escherichia coli* extra-intestinal) que envolve assim: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a sepse (SEPEC) e *E. coli* associada à meningite neonatal (NEMEC e/ou MNEC). As análises da epidemiologia molecular avaliaram ExPEC como sendo distintas das outras *E. coli* e ofereceram discernimento dentro da ecologia, evolução, reservatórios, vias de transmissão, interações parasito-hospedeiro, e mecanismos de virulência deste importante grupo de patógenos extra-intestinais.

Como mencionado, *E. coli* é a mais comum bactéria Gram-negativa isolada de infecções extra-intestinais; e, isolados do trato urinário, corrente circulatória, sistema nervoso central, trato respiratório, e peritônio demonstraram não só serem funcionalmente similares entre si quanto à virulência e filogenia, mas também totalmente distintos da *E. coli* patogênica intestinal e comensal (Johnson et al., 2003; Johnson e Russo, 2002; Russo e Johnson, 2000).

E. coli isolada da urina de pacientes com infecção no trato urinário e de pacientes com diversas outras infecções extra-intestinais (sangue, fluido cefalorraquidiano, etc), tipicamente exibe uma maior prevalência de marcadores moleculares específicos do que os isolados fecais de hospedeiros não infectados (Arthur et al. 1989; Bingen et al., 1997; Johanson et al., 1993; Maslow et al., 1993). Tais marcadores, que nada mais são do que genes codificadores para adesinas, toxinas, sistemas sideróforos, entre outros, são comumente definidos como FV, embora isto deva ser entendido como significando “fatores associados com”, não necessariamente “contribuindo a”, virulência, até que associações epidemiológicas não garantam casualidade.

Estes FV podem ser agrupados por categoria funcional; por exemplo, adesinas (Mitsumori et al., 1998), sistemas sideróforos (Russo et al., 2001 e 2002; Schubert et al., 1998; Torres et al., 2001), toxinas (Guyer et al., 2000; Rippere-Lampe et al., 2001), polissacarídeos de superfície (Russo et al., 1996), invasinas (Huang et al., 1999, 2001), caracteres associados à resistência sérica (Kanukollu et al., 1985), e características miscelâneas (Kurazono et al., 2000). Isolados clínicos frequentemente contêm múltiplos FV de uma categoria funcional. De modo oposto, em muitas cepas virulentas conhecidas faltam representantes de um ou mais dessas categorias funcionais (Johnson et al., 2001a, 2002). As implicações biológicas dessas redundâncias e déficits, que podem ser aparentes, são pobremente entendidas.

Certos FV frequentemente ocorrem juntos em padrões sugerindo co-seleção ou ligação genética direta (Johnson e Stell, 2000; Kanamura et al., 2003). A ligação direta dos FV foi demonstrada dentro das ilhas associadas a patogenicidade (PAIs) e nos plasmídios (Dobrindt et al., 2001; Le Bouguenec et al., 1993; Swenson et al., 1996). Cepas ExPEC muitas vezes contêm múltiplas PAIs, cada qual com uma combinação de fatores de virulência distinta, que muitas vezes resultam numa cepa contendo múltiplas cópias de um fator de virulência em particular, por exemplo, *pap* – o operon que codifica a fímbria P (Dobrindt et al., 2001; Welch et al. 2002).

Adicionalmente, a análise sequencial de PAIs, plasmídios de virulências, e genomas que contêm FV conhecidos invariavelmente revelou novos genes de funções desconhecidas,

alguns com homologia a FV estabelecidos de outras espécies (Dobrindt et al, 2001; Swenson et al., 1996; Welch et al., 2002). Esse fato demonstra a versatilidade de *E. coli* como patógeno extra-intestinal, sugerindo a existência de FV desconhecidos e/ou não-identificados.

As variações sequenciais (mutações) dentro de um gene de fator de virulência podem produzir importantes alterações fenotípicas no peptídeo/proteína sintetizado. Um único nucleotídeo variando no gene *fimH* (adesina da fímbria do tipo 1) gera polimorfismos que causam mudanças num único aminoácido do peptídeo FimH, que muda de um fenótipo de ligação tri-manose (associado a comensal) para um fenótipo mono-manose (associado a infecções do trato urinário) (Sokurenko et al., 1997). Um ponto de mutação adicional pode produzir uma substituição (Ser-62-Ala) que promove o fortalecimento da ligação mono-manose, possivelmente aumentando a urovirulência, e também conferindo ligação ao colágeno do tipo IV, talvez promovendo assim meningo-virulência (Pouttu et al., 1999). Variações mais abrangentes, que podem ser detectadas pelo uso de iniciadores ou sondas, ocorrem entre os vários alelos conhecidos de *papG* (adesina da fímbria P) (Johanson et al., 1993; Johnson et al., 2001b; Karkkainen et al., 1998). As variantes peptídicas correspondem a ligações preferenciais diferentes ao componente Gal(α 1-4)Gal dos glicopeptídeos (Stapleton et al., 1998; Stroud et al., 1998). Por causa da distribuição variada desses glicopeptídeos e sítios anatômicos e hospedeiros, a distinta preferência de ligação das variantes de PapG pode dar suporte às divergentes associações delas com síndromes clínicas e grupos de hospedeiros, tal como o PapG 2 com pielonefrite e de PapG 3 com cistite, e isolados de cachorros e gatos (Jantunen et al., 2000; Senior et al., 1992). Outros exemplos de famílias de FV com significativa diversidade molecular incluem a família *sfa/foc* (fímbrias S e F1C) (Ott et al., 1988), a família *afa/dra* (adesinas afimbriais e ligantes-Dr) (Le Bouguenec et al, 2001; Zhang et al., 1997), o grupo II e III de *kps* (cápsula) (Russo et al., 1998), e *cnf1* e *cnf2* (fator necrosante citotóxico 1 e 2; associado com virulência extra-intestinal e intestinal, respectivamente) (Blanco et al., 1992).

2. Septicemia

A septicemia é uma forma grave de infecção que cresce mundialmente e já é a décima causa de morte (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2004). Entre os pacientes internados nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) é a maior responsável pela mortalidade no Brasil. A infecção leva à inflamação de vários órgãos, o que provoca a morte do paciente se não houver uma intervenção rápida. É preocupante o aumento dos casos da doença, que pode

chegar a 140% nos próximos dez anos (OMS, 2004). De acordo com especialistas, um terço dos pacientes que vai para as UTIs já chega com septicemia ou vai adquiri-la lá dentro. No Brasil, estima-se que 70 mil pessoas são internadas com septicemia por ano, sendo que o crescimento dessa doença deve-se principalmente ao envelhecimento da população e aos tratamentos mais agressivos e invasivos que pacientes graves vêm recebendo (Álvaro Rea Neto, 2004¹).

Por definição, bacteremia é a presença de bactérias na corrente circulatória, podendo ou não indicar a presença de um foco de doença (Wilson, 1994). Nesta situação, decorre a septicemia, que indica um estado em que as bactérias estão causando infecções sistêmicas no hospedeiro, e na sepse, esses danos são bastante graves. Sinais e sintomas de septicemia podem incluir febre ou hipotermia, calafrios, hiperventilação e subsequente alcalose respiratória, lesões de pele, diarreia e alterações do comportamento. As mais sérias manifestações incluem hipotensão ou choque, coagulação intravascular disseminada e a falência de múltiplos órgãos (Bryan, 1989).

Contudo, ainda não se sabe ao certo como *E. coli* pode atingir a corrente sangüínea. Uma hipótese aceitável pressupõe que as septicemias surjam após uma infecção do trato urinário persistente, sendo que a porta de entrada para a circulação sanguínea ocorreria pelos rins, através dos néfrons (Mulvey, 2002; Sakarya et al., 2003; Davidson, 1987). Esta hipótese é plausível; porém, nunca foi efetivamente comprovada, sendo comum que as septicemias nem sempre sejam precedidas por uma infecção do trato urinário. Assim, a forma e o mecanismo da infecção septicêmica para *E. coli* não estão elucidados.

E. coli relacionadas às infecções extra-intestinais constituem um problema crescente para a medicina humana, especialmente devida á alta incidência de resistência às substâncias antimicrobianas. Além das infecções humanas, também causam infecções extra-intestinais em animais, ocasionando perdas econômicas, especialmente com relação ás aves domésticas. Os FV ainda não foram totalmente identificados, nem as diferenças entre os mecanismos de virulência dos vários sorotipos patogênicos (Mokady et al, 2005).

Sabe-se que quando patogênica, *E. coli* apresenta FV ausentes nos membros comensais desta espécie. Além disso, esses fatores, muitas vezes contidos em ilhas associadas a patogenicidade (PAIs), são bastante diferentes em amostras diarreiogênicas e extra-intestinais (Johnson et al., 2000). FV propriamente ditos são intervenções bacterianas diretamente relacionadas com os sintomas clínicos da doença. Contudo, mecanismos que permitem a sobrevivência e colonização bacteriana, com conseqüente proliferação, como forma de exploração parasítica de novos nichos no hospedeiro, também são englobados como FV.

¹Comunicação pessoal.

Entre os FV presentes em *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC), como já mencionado por categoria funcional, incluem adesinas, toxinas, revestimento polissacarídico (incluindo cápsulas e lipopolissacarídeos), sideróforos, mecanismos de resistência sérica e invasinas. Tais FV ajudam o microrganismo a colonizar as superfícies do hospedeiro, evitando e/ou subvertendo os mecanismos de defesa do mesmo, prejudicando e/ou invadindo suas células e tecidos, e incitando uma resposta inflamatória nociva, desse modo gerando uma doença clínica (Johnson et al., 2001a).

Acredita-se que os genes que codificam os FV não só sejam primariamente herdados verticalmente dentro de uma linhagem evolucionária, mas também sejam transferidos horizontalmente entre linhagens, em algumas instâncias sob plasmídios ou nas ilhas associadas à patogenicidade (PAIs) (Gophna et al., 2001).

O ferro é essencial para o metabolismo da maioria das bactérias conhecidas, com a exceção das lactobactérias e *Borrelia burgdorferi* (Island et al., 1998). Nos fluidos corporais dos animais endotérmicos o ferro é quase que totalmente restrito as proteínas transportadoras de ferro: transferrina e lactoferrina. Como resultado, a concentração de ferro livre sob estas condições é insuficiente para a sobrevivência e multiplicação das bactérias, e os patógenos dependem de sua habilidade em recolher ferro.

Hemolisina é considerada uma das principais toxinas bacterianas responsáveis pela obtenção de ferro. Pela lise dos eritrócitos, o ferro constituinte da hemoglobina liberada é solubilizado, sendo transportado por sideróforos e internalizado pela célula bacteriana (Arthur et al., 1989).

Não só a endotoxina - constituinte da parede bacteriana de Gram-negativos - como também as exotoxinas, podem causar grandes danos ao hospedeiro, como no caso da hemolisina, que além da capacidade de lisar eritrócitos, pode ser citotóxica na destruição de leucócitos, granulócitos, fibroblastos, células uroepiteliais, sendo então, apropriadamente denominada citolisina (Island et al., 1998). Outras exotoxinas associadas às infecções extra-intestinais são: o fator necrozante citotóxico do tipo 1 (CNF1) e a toxina autotransportadora secretada – Sat (Guyer et al., 2000).

Outro grupo de FV importante corresponde às adesinas, que são responsáveis pela aderência das bactérias aos receptores específicos em células epiteliais. Sabe-se que a habilidade de aderir às células da mucosa é essencial para iniciar a infecção bacteriana. As adesinas geralmente possuem propriedades hemaglutinantes que podem ser utilizadas para diagnósticos presuntivos laboratoriais, e estruturalmente podem estar associadas a fímbrias, como no caso da fímbria do tipo 1, fímbria P e fímbria S (Mitsumori et al., 1998).

O papel da adesão bacteriana na septicemia e infecções hematogênicas é pouco claro, mas sabe-se que a *E. coli* expressa a fímbria S no sangue durante a infecção septicêmica experimental em camundongos e ratos recém-nascidos (Ott et al., 1991). Estes achados sugerem que a fímbria S pode contribuir para a virulência da *E. coli* na septicemia, e para o entendimento da sua função patológica é importante identificar quais tecidos e células carregam ligantes para ela, além dos fatores capazes de inibir esta ligação (Saren et al., 1999).

Além de sideróforos, adesinas e toxinas, as *E. coli* associadas às infecções extra-intestinais, em especial a septicêmica, necessitam de uma propriedade essencial: a resistência sérica ou algum mecanismo que possibilite o escape do sistema imunológico do hospedeiro, especialmente driblando o sistema complemento.

FV que contribuem para a invasão de células do hospedeiro são denominados invasinas. Estas, ainda são pouco conhecidas para ExPEC, mas se sabe que a *E. coli* K1 invade as células endoteliais micro-vasculares cerebrais via um mecanismo “zipper-like” e transmigra através dessas células em um vacúolo anexo sem multiplicação intracelular (Ott et al., 1991). O operon *ibe* contribui para esse processo, traduzindo invasinas, como a *ibeA* (Huang et al., 1999, 2001; Pierre et al., 2005).

Estudos recentes comparando diferentes cepas (O2-1772 e O78-9) de ExPEC que causam as mesmas doenças clínicas (isoladas de ITU, meningite neonatal e colisepticemia aviária) (Mokady et al. 2005), revelaram um alto grau de diversidade genética, com apenas poucos genes compartilhados, e análises moleculares evidenciaram um alto grau de plasticidade genômica, diferentemente do que acontece em cepas patogênicas intestinais que são quase idênticas em termos de FV. Outrossim, vários dados obtidos para amostras septicêmicas sugerem que cada etapa da infecção pode ser mediada por um número diferente de FV, indicando a existência de um sistema combinatorial. Assim, FV diferentes são capazes de atingir os mesmos alvos teciduais no hospedeiro. Também, em adição ao alto nível de plasticidade genômica, o amplo “pool” de genes de virulência em cepas septicêmicas é independente do hospedeiro, implicando em um alto grau de risco zoonótico (Mokady et al., 2005).

Portanto, estudar as propriedades de virulência das *E. coli* isoladas em casos clínicos de septicemia é necessário para entender um possível mecanismo de infecção septicêmica em humanos, particularmente.

II. OBJETIVOS

Detecção, por métodos moleculares, de fatores de virulência em 73 amostras de *Escherichia coli* isoladas por hemocultura de pacientes septicêmicos.

Caracterização bacteriológica, tais como sorotipagem (antígeno O), produção de hemolisinas, produção de enzimas e letalidade em camundongos.

1. Objetivos específicos

Caracterização genotípica das 73 amostras de *E. coli* para os genes associados aos seguintes fatores de virulência associados à *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC): fímbria tipo 1 (*fimH*), fímbria P (*papC*, *papG1*, *papG2*, *papG3*), fímbria S (*sfaD/E*), cápsula (*kpsMTII*), aerobactina (*iucD*), yersinibactina (*fyuA*), salmoquelina (*iroN*), α -hemolisina (*hlyA*), fator necrosante citotóxico tipo 1 (*cnfI*), invasão do microendotélio cerebral (*ibeA*), resistência sérica (*traT*), colicina V (*cvaC*), proteína uropatogênica específica (*usp*), adesina afimbrial (*afaB/C*) e toxina autotransportadora secretada (*sat*).

Também, teste de letalidade em camundongos; detecção biológica enzimática para: hemolisina, protease e lecitinase; e, sorológica, para o antígeno O.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostras de *Escherichia coli*

As setenta e três (73) amostras de *Escherichia coli* provenientes de pacientes septicêmicos, clinicamente diagnosticados pelo Hospital de Clínicas da Unicamp, foram isoladas por hemocultura entre 1998 e 2001 pelo Laboratório de Patologia Clínica (Seção de Microbiologia Clínica) – HC – Unicamp.

A confirmação da identificação das amostras foi realizada utilizando-se a série bioquímica específica para enterobactérias, a qual foi repetida periodicamente para as amostras durante o desenvolvimento deste estudo.

2. MÉTODOS BIOLÓGICOS

2.1. Determinação do sorogrupo O

A determinação do sorogrupo das 73 amostras analisadas foi realizada com base nos 181 anti-soros O descritos (Blanco et al., 1992), gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Domingos da Silva Leite (Instituto de Biologia – Unicamp). Após cultivo em TSB (Trypticase Soy Broth) por 24h a 37°C, as bactérias foram suspensas em dois tubos contendo 2mL de solução salina, ajustada a turvação semelhante à concentração de $1,8 \times 10^8$ bactérias/mL, tubo número 6 da escala de MacFarland. Os tubos foram aquecidos por autoclavagem para a exposição do antígeno O.

A determinação presumível do antígeno O ocorreu quando a amostra apresentou aglutinação frente a um dos 181 anti-soros, e a prova confirmativa se deu pela titulação do antígeno O pressuposto. As amostras que não apresentaram aglutinação frente a nenhum dos anti-soros foram consideradas como não-tipáveis (NT) (Blanco et al., 1992).

2.2 Teste de hemolisina

A atividade hemolítica foi avaliada em triplicata para todas as amostras utilizando-se ágar sangue base contendo 5% de humano em heparina. O sangue foi cedido por voluntários saudáveis.

Todas as amostras testadas foram semeadas superficialmente e por profundidade (picada) e incubadas a 37°C por 24h para averiguação do halo de hemólise, e comparação com controle positivo (*E. coli* P46) e negativo (*E. coli* DH5α) (Simi, 2004).

2.3 Teste de protease

Para se testar produção de proteases pelas amostras septicêmicas de *E. coli*, placas de TSA foram preparadas acrescentando-se 3% de leite desnatado (skin milk). Cepas positivas para protease conseguem hidrolisar a caseína, e o resultado é visualizado na placa pela formação de um halo com transparência. (Davidson, 1987).

Pseudomonas aeruginosa foi utilizada como controle positivo para o experimento.

2.4 Teste de lecitinase

As placas para o teste da lecitinase foram feitas utilizando-se TSA (Trypticase Soy Agar) enriquecidas com 10% de gema de ovo, conforme Lombard, Thompson e Armfield (Communicable Disease Centres (CDC), Atlanta, GA, USA).

Para o preparo das placas foram utilizados 40,0g de caseína pancreática; 5,0g de extrato de levedura; 2,0g de dextrose; 2,0g de cloreto de sódio (NaCl); 5,0g de fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); 0,2mL de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em 5% de solução aquosa; 25,0g de ágar; 900,0mL de água deionizada; e 100,0mL de suspensão de gema de ovo.

Pseudomonas aeruginosa também foi utilizada como controle positivo para o experimento.

2.5 Letalidade em camundongos

Fêmeas SPF (Specific Pathogen Free) de camundongos da linhagem Swiss (seis a oito semanas de idade, 25 a 30g) foram adquiridas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (Unicamp, São Paulo, Brasil). As amostras de *E. coli* foram semeadas para crescimento em meio TSA (Trypticase Soy Broth) e incubadas em movimento a 37°C a uma densidade de aproximadamente 10⁹ bactéria por mL (aproximadamente 4h). A contagem bacteriana foi determinada pela medida da densidade óptica a 530nm. Amostras de 2mL de cada cultura foram então centrifugadas a 2,500 X g (aprox. 4000 rpm) por 10min, lavadas duas vezes com tampão PBS (Phosphate-buffered saline) e ressuspendidas no mesmo tampão. Estas suspensões foram inoculadas nos camundongos intraperitonealmente. Dez camundongos foram inoculados com cada amostra. Depois da inoculação, os camundongos foram observados a cada hora até a 6^a hora após a inoculação, na 18^a hora após a inoculação e diariamente até o limite de uma semana. A morte e a sua resistência foram anotados para cada camundongo.

Na tentativa de diminuir o número de testes, as 73 amostras foram divididas em 13 categorias (Quadro 1) com base na quantidade de FV possuidoras reveladas pelas reações em cadeia da polimerase. Assim, a categoria 1 caracterizou-se por possuir amostras contendo apenas um único FV; a categoria 2, dois fatores; e assim sucessivamente. A distribuição das amostras entre as categorias foi bastante heterogênea e a(s) amostra(s) representante de cada grupo foi escolhida aleatoriamente. Como controle negativo para a letalidade, utilizou-se a amostra DH5α de *E. coli*.

Quadro 1. Letalidade em camundongos: categorias e respectiva amostra representante

Categoria	Amostra	Categoria	Amostra
1	23	8	59
2	10	9	15
3	24	10	25
4	20	11	22
5	51	12	65
6	42	13	12
7	40		

3. MÉTODO MOLECULAR (CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA)

3.1 Preparação do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada conforme Blanco et al., 1997, com modificações. As amostras foram inicialmente pré-cultivadas em BHI a 37°C por 24 horas e foram semeadas no TSA (Trypticase Soy Agar) e incubadas a 37°C por 24h para a obtenção de crescimento confluyente. Uma alçada foi suspensa em 300µL de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0), “vortexada” e fervida a 100°C por 10 min para a liberação do ácido nucléico, e depois centrifugada a 12000 rpm por 3min. O “pellet” foi descartado e o sobrenadante (lisado) foi aliquotado e estocado a -20°C, até o momento do uso. A qualidade do DNA foi medida por espectrofotometria.

3.2 Iniciadores, produto amplificado e temperatura de anelamento.

Os iniciadores (primers), o tamanho em pares de bases dos genes analisados e a temperatura de anelamento da PCR estão elucidados no Quadro 2.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As PCRs foram realizadas utilizando-se 7µL do DNA bacteriano num volume final de 30µL, incluindo 3µL de tampão com MgCl₂ (Fermentas), 0,25 µL de dNTP Set 100mM Solutions Fermentas, 1 µM de cada iniciador e 1U de DNA Taq Polymerase Fermentas. As PCRs multiplex foram realizadas para o genes cujos iniciadores apresentam a mesma temperatura de anelamento (Quadro 2).

3.4 Eletroforese em gel de agarose

O processo de eletroforese em gel de agarose seguiu os princípios definidos por Sambrook et al., 1989. Assim, para a leitura do resultado das amplificações, 5µL do tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficoll) foi misturado no produto da reação. Foram aplicados 10µL da mistura na cavidade preparada em

gel de agarose em percentagem específica ao tamanho em pares de bases (pb) do produto amplificado, variando de 1% a 2% (Amersham Pharmacia Biotech/Suécia), em tampão Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M pH 8,0 (TAE). A identificação da banda foi feita mediante incubação em solução de brometo de etídio (1,5 μ L/mL) por 15' e visualizada em transiluminador de luz UV. Para registro, os géis foram fotografados através do sistema ImageMaster VDS (Amersham Pharmacia Biotech Inc. EUA).

Além disso, foi utilizado um padrão de peso molecular ("ladder"), capaz de marcar intervalos de 100 pb, possibilitando a conferência do produto de amplificação.

Quadro 2. Iniciadores, produto amplificado e temperatura de anelamento.

Gene	Descrição	Seqüência (5'-3')	Produto (pb)	A.T. (°C)	Controle	Referência
<i>papC</i>	Proteína de membrana externa da Fímbria P	GACGGCIGTACIGCAGGGIGIGGCG	328	60	J96	7
<i>papC'</i>		ATATCCTPKTGCAGGGATGCAATA				
<i>papG1</i>	Alelos da adesina fimbrial P	CAACCTGCTCTCAATCTTTACTG	692 (<i>papG1</i>), 562 (<i>papG2</i>) e 421 (<i>papG3</i>)	63	J96 e FVL8	30
<i>papG2</i>		GGAATGTGGTGATTACTCAAAGG				
<i>papG1,III</i>		CATGGCTGGTTGTTCTTAAACAT				
<i>papG2,III</i>		TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC				
<i>fimH</i>	Adesina fimbrial do tipo 1	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	63	ORN115	25
<i>fimH'</i>		GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA				
<i>iucD</i>	Biossíntese da aerobactina	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	63	FVL8	72
<i>iucD'</i>		AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG				
<i>fyuA</i>	Receptor da yersiniabactina	CGCAGTAGGCAGGATGTTGTA	780	57	J96	10
<i>fyuA'</i>		GCGACGGGAAGCGATGATTTA				
<i>iroN</i>	Receptor de membrana externa da salmoquelina	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCC	665	63	J96	25
<i>iroN'</i>		GACGCCGACATTAAGACGCAG				
<i>sat</i>	Toxina autotransportadora secretada	GTTGTCTCTGGCTGTTGC	501	53	FBC114	Este estudo
<i>sat'</i>		AATGATGTTCTCCAGAGC				
<i>cnf1</i>	Fator necrosante citotóxico do tipo 1	GAAC TTATTAAGGATAGT	543	63	FVL8	5
<i>cnf1'</i>		CATTATTTATAACGCTG				
<i>ibeA</i>	Invasão do endotélio microvascular cerebral	TGAACGTTTTCGGTTGTTTTG	800	52	APEC	45
<i>ibeA'</i>		TGTTCAAATCCTGGCTGGAA				
<i>traT</i>	Resistência sérica	ACTAATGATGGTTGCACT	720	55	J96	66
<i>traT'</i>		TAATCAGAGAATATTTGCGAT				
<i>cvaC</i>	Gene estrutural da proteína colicina V	TATGAGAACTCTGACTCTAAAT	314	55	colV+	66
<i>cvaC'</i>		ATTTATAAACAACATCACTAA				
<i>usp</i>	Proteína uropatogênci específica	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT	1000	66	J96	38
<i>usp'</i>		CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT				
<i>afaB/C</i>	Adesina afimbrial	GCTGGGCAGCAAACKATAACTCTC	750	76	FV35	72
<i>afaB/C'</i>		CATCAAGCTGTTTGTTTCGTCGCCG				
<i>hlyA</i>	Gene estrutural da hemolisina	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	63	FVL8	72
<i>hlyA</i>		ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA				
<i>kpsMTII</i>	Cápsula	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	63	U9-41	19
<i>kpsMTII'</i>		CATCAGACGATAAGCATGAGCA				
<i>sfaD/E</i>	Fímbria S	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	63	FVL2	7
<i>sfaD/E'</i>		CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC				

papC: iniciador “forward”, *papC'*: “reverse”.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. MÉTODOS BIOLÓGICOS

1.1 Sorogrupagem: antígeno O

Para as 73 amostras analisadas foram encontradas 20 diferentes sorogrupos para o antígeno O, incluindo o tipo rugoso e as amostras não-tipáveis (NT). A Tabela 1 elucida os resultados obtidos.

Tabela 1. Percentagem de amostras de *E. coli* distribuídas entre os sorogrupos O encontrados.

Sorogrupo	Total de amostras positivas	Percentagem (%)	Sorogrupo	Total de amostras positivas	Percentagem (%)
O1	2	2,7	O25	2	2,7
O2	10	13,7	O75	3	4,1
O4	1	1,4	O78	1	1,4
O6	6	8,2	O86	1	1,4
O7	2	2,7	O99	1	1,4
O11	2	2,7	O141	2	2,7
O16	1	1,4	O153	2	2,7
O17	7	9,6	O173	1	1,4
O19	3	4,1	RUGOSO	4	5,5
O20	1	1,4	NT*	21	28,8

* Amostras de *E. coli* não-tipáveis.

A Tabela 1 evidencia que as amostras não-tipáveis (28,8%) e rugosas (5,5%) correspondem a 34,2% das amostras. O sorogrupo O2 e O17 foram os mais prevalentes, 13,7% e 9,6%, respectivamente. A análise dos resultados obtidos foi realizada conforme dados disponibilizados pelo “Laboratorio de Referencia de *E. coli*” – LREC² (Universidade de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, Lugo, Espanha). Os sorogrupos de maior prevalência nas infecções urinárias e septicêmicas humanas: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O12, O14, O15, O16, O17, O18, O21, O22, O25, O50, O75, O77, O78, O81, O83, O85 e O86 foram detectados em 52,1% das amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com

²<http://www.lugo.usc.es/ecoli/>

septicemia e os restantes distribuíram-se entre os sorotipos O19, O20, O99, O141, O153 e O173 (13,7%).

Excluindo-se os resultados de amostras NT e rugosas, os sorogrupos O encontrados reforçam uma possível origem uropatogênica das amostras desse estudo. Com base nos sorogrupos esperados, não foram encontradas amostras pertencentes aos sorogrupos O8, O9, O12, O14, O15, O18, O21, O22, O50, O77, O81, O83 e O85.

A Tabela 2 resume a associação entre diversos patotipos de *E. coli* e os sorogrupos O encontrados para as 13,7% das amostras que não se enquadraram como uropatogênicas/septicêmicas com base na sorologia de referência para o antígeno O.

Tabela 2. Associação* entre diversos patotipos de *E. coli* e sorogrupo O para 13,7% das amostras de *E. coli* isoladas de septicemia em humanos.

Sorogrupos	O19	O20	O99	O141	O153	O173
Prevalência	3	1	1	2	2	1
(%)	(4,1%)	(1,4%)	(1,4%)	(2,7%)	(2,7%)	(1,4%)
<i>E. coli</i> verotoxigênica (VTEC) humana e animal		X		X	X	
<i>E. coli</i> verotoxigênica (VTEC) bovina		X		X	X	
Cepas de <i>E. coli</i> patogênicas animal		X		X	X	
Cepas de <i>E. coli</i> enteropatogênicas suína		X		X	X	
Cepas de <i>E. coli</i> enteropatogênicas em coelhos		X			X	
Cepas de <i>E. coli</i> septicêmicas aviária		X				
Cepas de <i>E. coli</i> enteropatogênicas bovina		X				
Cepas de <i>E. coli</i> necrotoxigênica bovina CNF2+					X	
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC) humana		X				
<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) humana		X			X	
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAggEC/EPEC) humana			X	X	X	

* A associação positiva é representada pelo X [vide linha (patotipo de *E. coli*) e coluna (sorogrupo O encontrado)].

Dessa forma, verificamos que os sorogrupos O19 e O173 não se relacionam com os patotipos mencionadas na Tabela 2, e também não demonstraram associações com outros patotipos de *E. coli* que não foram citadas na Tabela 2. A importância desse tipo de associação consiste na inferência de possíveis reservatórios ou FV para ExPEC, que podem estar relacionados com o contágio ou via de infecção, o que ainda é pouco claro para SEPEC.

Além disso, os sorogrupos O associados a UPEC e SEPEC em humanos podem também estar associados a outros patotipos de *E. coli*. A Tabela 3 relaciona alguns desses outros itens em associação com os sorogrupos O encontrados.

Tabela 3. Associação* entre diversos patótipos de *E. coli* e sorogrupo O para 52,1% das amostras de *E. coli* isoladas de humanos septicêmicos.

Sorogrupos	O1	O2	O4	O6	O7	O11
Prevalência (%)	2 (2,7%)	9 (12,3%)	1 (1,4%)	6 (8,2%)	2 (2,7%)	2 (2,7%)
<i>E. coli</i> verotoxigênica (VTEC) humana e animal	X	X	X	X		
<i>E. coli</i> verotoxigênica (VTEC) bovina		X	X	X		
<i>E. coli</i> verotoxigênica (VTEC) ovina				X		
Cepas de <i>E. coli</i> patogênicas animal	X	X				
Cepas de <i>E. coli</i> septicêmicas aviária	X	X		X		X
Cepas de <i>E. coli</i> necrotoxigênica bovina CNF2+	X	X				
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC) humana						
<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) humana			X	X	X	
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAaggEC/EAEC) humana			X	X	X	X
<i>E. coli</i> necrotoxigênica CNF1+ humana e animal	X	X	X	X		

Sorogrupos	O16	O17	O25	O75	O78	O86
Prevalência (%)	1 (1,4)	7 (9,6%)	2 (2,7%)	3 (4,1%)	1 (1,4%)	1 (1,4%)
<i>E. coli</i> verotoxigênica (VTEC) humana e animal	X	X		X		X
<i>E. coli</i> verotoxigênica (VTEC) bovina	X					
<i>E. coli</i> verotoxigênica (VTEC) ovina						
Cepas de <i>E. coli</i> patogênicas animal					X	
Cepas de <i>E. coli</i> septicêmicas aviária		X			X	
Cepas de <i>E. coli</i> necrotoxigênica bovina CNF2+				X	X	X
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC) humana						X
<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) humana		X		X	X	
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAaggEC/EAEC) humana		X			X	X
<i>E. coli</i> necrotoxigênica CNF1+ humana e animal			X	X	X	X

* A associação positiva é representada pelo X [vide linha (patótipo de *E. coli*) e coluna (sorogrupo O encontrado)].

Portanto, apesar de todas essas 38 amostras (52,1% do total das amostras desse estudo) terem em comum o fato de apresentarem sorogrupos O relacionados com UPEC e SEPEC em humanos, é notável a diversidade de outras associações que podem ser configuradas com base no sorogrupo O. Neste estudo, as amostras foram genotipadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a toxina CNF1, e a relação com os sorogrupos O associados com a produção de CNF1 encontrados neste trabalho - O1, O2, O4, O6, O25, O75 e O78 - mostrou-se parcialmente verdadeira. Das 26 amostras distribuídas entre esses sorogrupos, 13 amostras (50,0%) efetivamente apresentaram a amplificação do gene responsável pela produção de CNF1. E, nenhuma amostra mostrou positividade para o CNF1 que não fosse pertencente aos sorogrupos relacionados para tal.

Dessa forma, apesar de certos FV não terem sido abordados nesse estudo, como o CNF2 e a verotoxina – ambos associados à doença animal –, é possível que dentre as amostras desse estudo exista positividade para outros FV que não aqueles descritos pela literatura científica como estando associados à ExPEC (Mokady et al., 2005). Como já mencionado na introdução, ExPEC caracteriza-se pela versatilidade em termos de FV, e diferentes deles podem atuar como num sistema combinatorial, em que diferentes FV podem atuar para o mesmo objetivo em etapas diversas do processo infeccioso. Pelas associações demonstradas com base nos sorogrupos O, *E. coli* de importância patogênica veterinária, por exemplo, poderiam utilizar fatores de colonização, adesinas, fímbrias, ou até mesmo toxinas na conquista de novos nichos que não os intestinais (Mokady et al., 2005). O limiar desse processo poderia se dar pela presença de sistemas sideróforos, uma vez que o ferro – essencial para o desenvolvimento bacteriano – encontra-se extremamente escasso e/ou complexado (indisponível) fora do habitat intestinal.

1.2. Teste de hemolisina

Das 73 amostras analisadas para a produção de hemolisina em placas de ágar sangue humano, 15 (20,5%) apresentaram o halo característico das cepas α -hemolíticas. De modo semelhante, a presença do operon *hly* que codifica a α -hemolisina foi detectada em 19,2% das amostras pela técnica da PCR. Contudo, a discrepância entre amostras positivas para um teste (biológico) e negativas para outro (molecular), e vice-versa, ocorreu em três amostras. Dessas três, duas produziram o halo de hemólise na placa de ágar sangue, mas foram negativas para a PCR; e uma amostra mostrou-se negativa para o teste biológico, porém, o gene *hlyA* foi amplificado.

No primeiro caso, existe a possibilidade de realmente as amostras não possuírem o operon *hly*, descartando-se assim qualquer possível falha na PCR. Assim, a hemólise pode estar sendo ocasionada por outro FV que não a α -hemolisina.

No segundo caso, existe a possibilidade de alguma falha genética contida no operon *hly*, assim como Johnson et. al (1998) descreveu para o operon *pap*. Sabe-se que este, como qualquer outro operon, é formado por diversos genes contíguos. A presença do gene *hlyA*, detectado pela PCR, não garante a ausência de outro do mesmo operon, e neste caso, a funcionalidade do mesmo estaria prejudicada. Nos processos de transmissão horizontal de FV,

existe a possibilidade de falhas ou transmissões incompletas, como no caso da transformação (Johnson et al., 2001a; Mokady et al. 2005).

Com relação ao dado referente ao total de amostras hemolíticas - 20,5% -, há coerência com os trabalhos relacionados a ExPEC (Ott et al., 1991; Picard et al., 1999). Segundo Tiba (2003), a α -hemolisina foi encontrada em 25,3% dum total de 162 amostras de UPEC. Dentre diversos trabalhos analisados, ocorrem prevalências variadas para hemolisina: segundo Oliveira (1996), 37,8% dum total de 90 amostras de *E. coli* isoladas de bacteriemia em humanos mostraram-se positivas para este fator de virulência, sendo que a detecção foi biológica. Nos trabalhos de Johnson et al. (1998), Yamamoto et al. (1995) e Johnson et al., (2005) as prevalências para α -hemolisina detectada pela PCR foram de 39,0%, 41,2% e 57,0%.

1.3. Teste de protease

Nenhuma amostra de *E. coli* produziu protease. A atividade proteolítica em SEPEC poderia explicar possíveis vias de infecção para a septicemia, pois o modo como ExPEC invade a corrente circulatória é ainda incerto. Contudo, o resultado obtido neste trabalho é concordante com o padrão genérico enzimático e bioquímico para *E. coli* (Yabuuchi, 1997).

1.4. Teste de lecitinase

Nenhuma amostra de *E. coli* produziu lecitinase. A atividade lipolítica em SEPEC poderia explicar possíveis vias de infecção para a septicemia, pois o modo como ExPEC invade a corrente circulatória é ainda incerto. Todavia, o resultado obtido neste estudo é concordante com o padrão genérico enzimático e bioquímico para *E. coli* (Yabuuchi, 1997).

A produção de lecitinase não é característica de *E. coli* (Yabuuchi, 1997), mas poderia estar relacionada com cepas de infecções extra-intestinais, embora não haja trabalhos recentes na literatura científica associando ExPEC com a produção de lecitinase. Contudo, Hashia et al. (1981) relataram a produção de fosfolipase A em alta prevalência não só por UPEC, mas também por *E. coli* isoladas do trato gastrointestinal. Lecitinase pode ser considerada qualquer

uma de várias enzimas que hidrolisam a lecitina, englobando também as fosfolipases. Portanto, os resultados encontrados diferem da publicação científica de Hashia et al. (1981).

1.5 Letalidade em camundongos

Os dados da Tabela 4 (página 23) podem esclarecer as características genotípicas de cada amostra utilizada no teste de letalidade e o Quadro 3 elucida os resultados obtidos.

Quadro 3. Letalidade em camundongos: resultados

Categoria	Amostra	Letalidade	Categoria	Amostra	Letalidade
1	23	0	8	59	10
2	10	0	9	15	10
3	24	0	10	25	0
4	20	0	11	22	3
5	51	8	12	65	10
6	42	0	13	12	10
7	40	5			

As seguintes amostras: 10 (categoria 2), 20 (categoria 4), 23 (categoria 1), 24 (categoria 3), 25 (categoria 10) e 42 (categoria 6) não foram capazes de matar nenhum dos dez camundongos inoculados. Com exceção da amostra 25, possuidora de 10 dos 18 genes testados, o resultado obtido para as amostras acima foram esperados (Picard et al., 1999).

As amostras 22 (categoria 11), 40 (categoria 7) e 51 (categoria 5) apresentaram letalidade não-total, matando, respectivamente três, cinco e oito dos dez camundongos inoculados. Nessas amostras, os FV prevalentes foram a α -hemolisina, o fator necrosante citotóxico do tipo 1, a proteína uropatogênica específica, os sideróforos salmoquelina e yersiniabactina, a fímbria P (alelo 3), e cápsula. Estes apresentavam prevalência de 75%, ou seja, estavam sempre presente em três, das quatro amostras. 100% delas possuíam a fímbria do tipo 1.

As amostras que foram capazes de matar 100% dos camundongos inoculados foram: 12 (categoria 13), 15 (categoria 9), 59 (categoria 8), e 65 (categoria 12). Dessas amostras, todas possuíam a proteína uropatogênica específica, a yersiniabactina, a fímbria do tipo 1 e cápsula. A fímbria S, a fímbria P (alelo 2,3 e 3), aerobactina, salmoquelina, toxina autotransportadora secretada e o fator necrosante citotóxico do tipo 1 estavam presentes em três quartos das

amostras. Além disso, metade delas possuíam α -hemolisina e o gene *traT* – associado a resistência sérica.

Apesar da característica um tanto preliminar deste ensaio, de maneira geral (com exceção da amostra 25), quanto mais FV uma amostra possui, maiores as chances de haver letalidade em camundongos. A presença da fímbria P associada a toxinas parece desempenhar importante papel no processo de letalidade, estando presente em 75% das amostras que mataram camundongos, e em quase 25% para aquelas que apresentaram letalidade nula.

2. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Podemos agrupar os FV em categorias (Mokady et al, 2005) como cápsulas, adesinas fimbriais e afimbriais, mecanismos de captação de ferro (sideróforos), toxinas e FV miscelâneos (escape do sistema imunológico, bacteriocinas, invasão, etc.). A prevalência dos genes detectados pela PCR associados com os FV das amostras em estudo e sua categoria está definida pela Tabela 5 e pelo Gráfico 1.

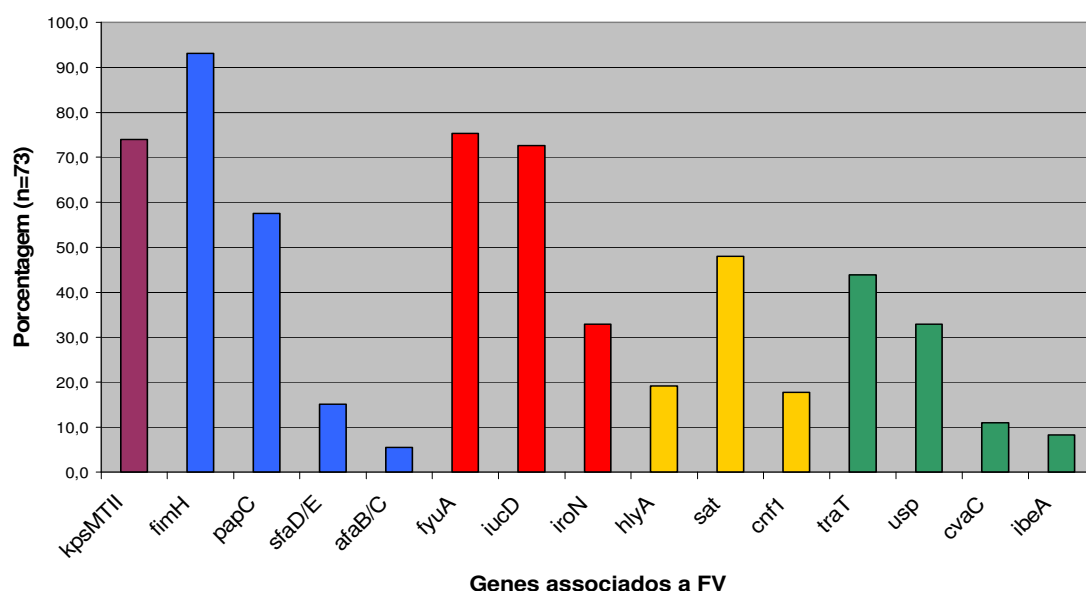


Gráfico 1. Percentagem de genes associados a fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de humanos septicêmicos.

Tabela 4. Sorogrupos O e características genótípicas das 73 amostras de *E. coli* isoladas de humanos septicêmicos.

A.*	Ant. O	Hly	Cápsula	Fímbrias e Adesinas					Captação de Ferro				Toxinas		Miscelâneos			
			<i>kpsMTII</i>	<i>sfaD/E</i>	<i>papC</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>	<i>afaB/C</i>	<i>iucD</i>	<i>fyuA</i>	<i>iroN</i>	<i>hlyA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1</i>	<i>ibeA</i>	<i>traT</i>	<i>cvaC</i>	<i>usp</i>
1	O6	+	+	+	+	3	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
2	O75	+	+	+	+	2	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
3	O7	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
4	NT	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5	O7	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
6	O141	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
7	O4	+	+	+	+	3,2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
8	NT	-	-	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	O99	-	+	-	-	NT	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
10	Rugosa	-	-	-	-	NT	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	O2	-	+	+	+	3,2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
13	O11	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
14	O6	+	+	+	+	3	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
15	O25	-	+	-	-	NT	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
16	O17	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
17	NT	-	+	-	-	NT	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
18	NT	-	+	-	-	NT	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
19	O153	-	+	-	-	NT	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
20	O153	-	+	-	-	NT	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
21	O141	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	O25	+	+	+	+	3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
23	NT	-	-	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Rugosa	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
25	Rugosa	+	+	-	+	3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
26	O20	-	-	-	-	NT	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
27	NT	-	+	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
28	NT	-	+	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
29	NT	-	+	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
30	O19	-	-	-	-	NT	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
31	O19	-	-	-	-	NT	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
32	NT	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
33	NT	-	-	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	O2	+	+	-	+	3,2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
35	O2	+	+	+	+	3,2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
36	O17	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
37	O17	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
38	O16	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
39	O173	-	-	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
40	O6	+	+	-	+	3	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
41	O17	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
42	O78	-	-	-	-	NT	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
43	NT	-	-	-	-	NT	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
44	O75	+	+	+	+	2	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
45	NT	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
46	O17	-	+	-	+	2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
47	O2	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
48	O2	-	+	-	+	2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
49	O2	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
50	O2	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabela 4. Continuação.

A.*	Ant. O	Hly	Cápsula	Fímbrias e Adesinas					Captação de Ferro				Toxinas		Miscelâneos			
			<i>kpsMTII</i>	<i>sfaD/E</i>	<i>papC</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>	<i>afaB/C</i>	<i>iucD</i>	<i>fyuA</i>	<i>iroN</i>	<i>hlyA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1</i>	<i>ibeA</i>	<i>traT</i>	<i>cvaC</i>	<i>usp</i>
51	O19	-	-	-	-	NT	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
52	NT	-	-	-	-	NT	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
53	NT	-	+	-	-	NT	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
54	O1	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
55	O6	+	+	+	+	3	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
56	O17	-	+	-	+	2	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
57	O17	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
58	O75	+	+	-	-	NT	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
59	O6	+	+	+	+	3	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
60	O86	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
61	O11	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
62	O2	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
63	Rugosa	-	+	-	-	NT	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
64	O1	-	+	-	+	2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
65	O2	+	+	+	+	3,2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
66	NT	-	+	-	-	NT	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
67	NT	-	-	-	-	NT	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
68	NT	-	-	-	-	NT	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
69	O17	-	+	-	+	2	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
71	NT	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
72	O6	+	-	-	+	3	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
73	NT	-	-	-	-	NT	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
74	NT	-	-	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	NT	-	+	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

* Número da amostra.

Em termos quantitativos, as amostras de *E. coli* em estudo apresentaram alta incidência (prevalência) do gene *kpsMTII* (74,0%), que se relaciona com a resistência ao soro e escape do sistema imunológico que bactérias septicêmicas necessitam apresentar como pré-requisito para a sobrevivência na corrente circulatória (Russo et al., 1996). Além disso, condizente com a literatura científica, a prevalência da fímbria P (*papC* e *papG*) superior a 50% nos remete às infecções do trato urinário (Stapleton et al., 1998; Stroud et al., 1998), que pela hipótese da via ascendente poderia apresentar-se como porta de entrada para a corrente circulatória, através dos néfrons. É notável a prevalência do alelo 2 de *papG*, relacionado a pielonefrite (Gráfico 2). Contudo, o alelo 3 de *papG* - relacionado à cistite - apresentou elevada associação com outras propriedade de virulência estudadas, como o fator necrosante citotóxico do tipo 1 e a α -hemolisina, igualmente descrito por Bingen-Bidois et al. (2002). Neste estudo, os autores descreveram amostras de urosepse carregando uma PAI onde *papG3* estava fisicamente ligada a *hly* e *cnf1*, igualmente à já bem descrita PAI II de uma UPEC

arquetípica denominada J96 (Quadro 2), a qual foi utilizada nesse estudo como controle positivo para diversos genes associados à FV.

Para atingir a corrente circulatória, partindo de cistite (bexiga) e pielonefrite (rins), é possível que *E. coli* dependa de mais fatores de virulência no caso da cistite, uma vez que a infecção nos rins está a um passo da corrente circulatória, diferentemente daquela na bexiga. Amostras de cistite são capazes de invadir, mediante a fímbria do tipo 1, células epiteliais da luz da parede da bexiga e transformá-las em verdadeiras “fábricas de bactérias” (Mulvey, 2002); contudo, esse processo invasivo, dificilmente conseguiria atravessar o espesso epitélio pseudo-estratificado da bexiga.

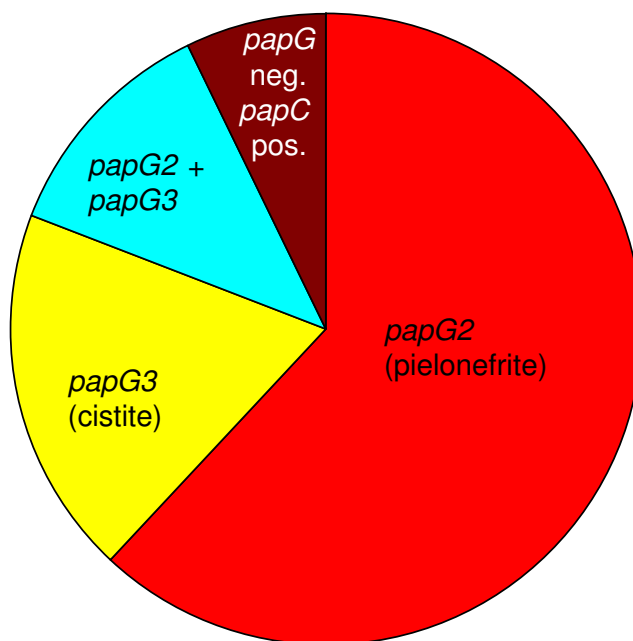
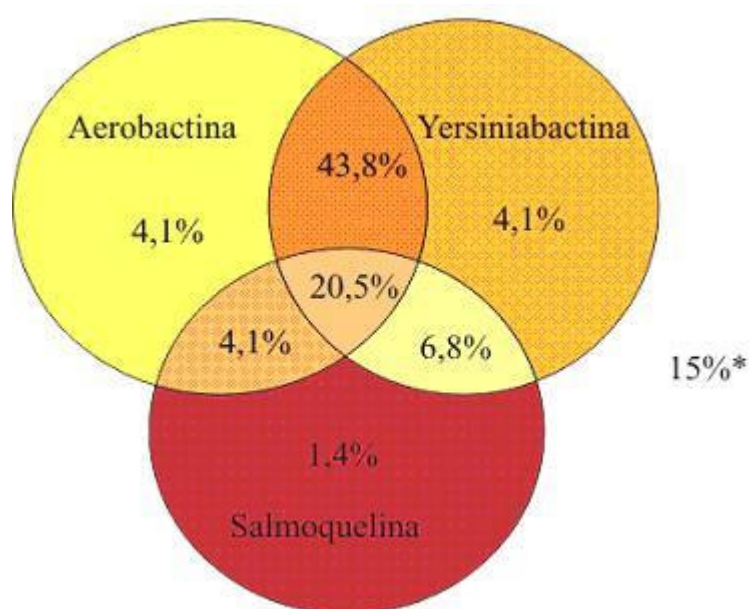


Gráfico 2. Distribuição dos alelos da adesina fimbrial P em amostras de *Escherichia coli* isoladas de septicemia em humanos.

A captação de ferro é outro importante mecanismo para a sobrevivência de *E. coli* na corrente circulatória. Contudo, nos fluidos corporais dos animais endotérmicos o ferro está quase que totalmente restrito às proteínas transportadoras de ferro: transferrina e lactoferrina. Como resultado, a concentração de ferro livre sob estas condições é insuficiente para a sobrevivência e multiplicação das bactérias, e os patógenos dependem de sua habilidade em

recolher ferro. Este fato explica a alta prevalência de sideróforos, como a aerobactina (72,6%), yersiniabactina (75,3%) e salmoquelina (32,95) nas amostras em estudo. Além disso, existe uma alta associação (64,3%) entre os sideróforos aerobactina e yersiniabactina. Cerca de 20,5% das amostras apresentaram os três mecanismos de captação de ferro concomitantemente. Contudo, a baixa associação da salmoquelina com os outros sideróforos pode indicar que a associação entre aerobactina e yersiniabactina seja mais eficiente na captação de ferro pelas amostras septicêmicas em estudo (Gráfico 3). Em termos de eficácia, é provável que os sistemas sideróforos atuem preferencialmente em determinados sítios anatômicos do hospedeiro, e no processo infeccioso, isso explicaria a alta prevalência combinatória entre eles.



* 15,0% das amostras não apresentaram nenhum dos sideróforos estudados.

Gráfico 3. Mecanismos de captação de ferro em amostras de *Escherichia coli* isoladas de humanos septicêmicos.

As toxinas: α -hemolisina (19,2%), fator necrosante citotóxico do tipo 1 (17,8%) e a toxina autotransportadora secretada (47,9%), juntamente com o gene *traT* (43,8%) relacionado à resistência sérica e a proteína uropatogênica específica (32,9%) tiveram prevalência menor, se comparadas com os sideróforos, cápsula e algumas adesinas; contudo, variando de aproximadamente 15% a 50% no total das amostras estudadas, a incidência daquelas também se mostra significativa, especialmente quando se parte do pressuposto de que *E. coli* pode se utilizar de diferentes propriedades de virulência para atingir a mesma

finalidade no processo infeccioso, como parte de um sistema combinatorial (Mokady et al., 2005).

Finalmente, os dados revelados pelas PCRs podem ser confrontados numa tabela que os associa entre si. Essa associação pode ser verificada na Tabela 5, em que na parte inferior esquerda os dados estão relacionados de forma numérica, e na parte superior direita em percentual, sendo que em vermelho estão aqueles acima de 80%.

Assim, mais uma vez comprova-se a associação do alelo 3 de *papG* com *hlyA* e *cnf1*, como relatado por Bingen-Bidois et al. (2002). Contudo, *usp*, *iroN* e *fyuA* também mostraram alta associação com *papG3*. Para as amostras *papG2*, todas (100%) se associaram aos sideróforos aerobactina e yersiniactina. Bingen-Bidois et al. (2002) também encontrou essa associação, igualmente Tiba (2003), que relatou 68,9% de amostras *papG2⁺iucD⁺*. Em se tratando de sítio anatômico, é possível que a eficiência da salmoquelina seja maior na bexiga (*papG3*) e a combinação aerobactina/yersiniabactina atue melhor para os sítios anatômicos afetados pela pielonefrite, particularmente o rim.

Quanto à toxina autotransportadora secretada (Sat), a associação com *papG2* foi significativa: 80,8% das amostras *papG2⁺* também foram *sat⁺*, em contraste às *papG3⁺*, em que *sat* foi encontrado em 25% das amostras.

Pela Tabela 5, também é possível observar associações significativas para *fimH*, contudo, essas associações refletem apenas a notável prevalência desse gene nas amostras estudadas (93,2%). O inverso também ocorre, pois para *afaB/C* (5,5%), *ibeA* (8,2%), *cvaC* (11,0%) os baixos índices de prevalência favorecem associações. Por exemplo, 100% das amostras *afaB/C⁺* possuem aerobactina, yersiniabactina, Sat e *traT*. As amostras *ibeA⁺* e *cvcA⁺* não demonstraram associações significativas.

Em suma, a alta prevalência de amostras encapsuladas e hábeis em seqüestrar ferro condiz com a origem septicêmicas das amostras em estudo, que necessariamente devem driblar o sistema imunológico do hospedeiro e seqüestrar ferro. Todavia, os genes com baixa prevalência parecem desempenhar significativa função na ausência dos genes com maior prevalência neste estudo.

Tabela 5. Associação numérica (esquerda inferior) e em percentual (direita superior) entre os genes de FV pesquisados nas 73 amostras de *Escherichia coli* isoladas de pacientes septicêmicos.

	Total	<i>kpsMTII</i>	<i>sfaD/E</i>	<i>papC</i>	<i>papG2</i>	<i>papG3</i>	<i>papG2,3</i>	<i>fimH</i>	<i>afaB/C</i>	<i>iucD</i>	<i>fyuA</i>	<i>iroN</i>	<i>hlyA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1</i>	<i>ibeA</i>	<i>traT</i>	<i>cvaC</i>	<i>usp</i>
<i>kpsMTII</i>	54		20,4	74,1	48,1	13,0	9,3	96,3	7,4	77,8	85,2	27,8	24,1	63,0	22,2	9,3	40,7	5,6	44,4
<i>sfaD/E</i>	11	11		100,0	18,2	45,5	36,4	100,0	0,0	63,6	100,0	90,9	90,9	63,6	72,7	0,0	0,0	0,0	90,9
<i>papC</i>	49	40	11		53,1	16,3	10,2	83,7	2,0	69,4	79,6	32,7	26,5	57,1	26,5	2,0	30,6	6,1	42,9
<i>papG2</i>	26	26	2	26				100,0	3,8	100,0	100,0	19,2	7,7	80,8	3,8	0,0	46,2	11,5	34,6
<i>papG3</i>	8	7	5	8				100,0	0,0	25,0	100,0	87,5	100,0	25,0	100,0	12,5	0,0	0,0	100,0
<i>papG2,3</i>	5	5	4	5				100,0	0,0	100,0	100,0	80,0	80,0	100,0	80,0	0,0	20,0	0,0	80,0
<i>fimH</i>	68	52	11	41	26	8	5		4,4	69,1	26,5	11,8	51,5	10,3	7,4	36,8	11,8	26,5	5,9
<i>afaB/C</i>	4	4	0	1	1	0	0	3		100,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	25,0	100,0	0,0	25,0
<i>iucD</i>	53	42	7	34	26	2	5	47	4		88,7	34,0	15,1	66,0	13,2	9,4	47,2	15,1	34,0
<i>fyuA</i>	55	46	11	39	26	8	5	18	4	47		36,4	25,5	63,6	23,6	7,3	41,8	9,1	43,6
<i>iroN</i>	24	15	10	16	5	7	4	8	0	18	20		54,2	37,5	45,8	4,2	37,5	33,3	62,5
<i>hlyA</i>	14	13	10	13	2	8	4	35	0	8	14	13		57,1	85,7	7,1	7,1	0,0	100,0
<i>sat</i>	35	34	7	28	21	2	5	7	4	35	35	9	8		20,0	8,6	37,1	2,9	40,0
<i>cnf1</i>	13	12	8	13	1	8	4	5	0	7	13	11	12	7		7,7	15,4	0,0	92,3
<i>ibeA</i>	6	5	0	1	0	1	0	25	1	5	4	1	1	3	1		16,7	0,0	66,7
<i>traT</i>	32	22	0	15	12	0	1	8	4	25	23	9	1	13	2	1		18,8	18,8
<i>cvaC</i>	8	3	0	3	3	0	0	18	0	8	5	8	0	1	0	0	6		25,0
<i>usp</i>	24	24	10	21	9	8	4	4	1	18	24	15	14	14	12	4	6	2	

Em vermelho, associações em percentagem acima de 80%.

V. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos pelas PCRs demonstraram que os genes *fimH* - fímbria do tipo 1 - (93,2%), *fyuA* - yersiniabactina - (75,3%), *kpsMTII* - cápsula K1/K5 - (74,0%), *iucD* - aerobactina - (72,6%) e *papC* - fímbria P - (57,5%) foram os mais prevalentes entre as 73 amostras de *E. coli* provenientes de pacientes com septicemia. Destes genes, um - *kpsMTII* - está relacionado com o escape do sistema imunológico do hospedeiro; dois deles, *fimH* e *papC*, correspondem a fímbrias (fatores de colonização); e os dois restantes - *fyuA* e *iucD* - estão relacionados à captação de ferro.
- Com prevalência significativa, mas abaixo de 50%, foram encontrados os genes *sat* – toxina autotransportadora secretada – e *usp* – proteína uropatogênica específica – ambos com prevalência de 47,9%. Relacionado à resistência sérica, o gene *traT* foi encontrado em 43,8% das amostras. O gene *iroN*, relacionado ao sideróforo salmoquelina, esteve presente em 32,9% do total de amostras.
- Os genes relacionados as toxinas hemolisina (*hlyA*) e fator necrosante citotóxico do tipo 1 (*cnfI*) apresentaram baixa prevalência nas amostras estudadas, totalizando 19,2% e 17,8%, respectivamente.
- Os genes *sfaD/E* (15,1%), *cvaC* (11,0%), *ibeA* (8,2%) e *afaB/C* (5,5%) foram os menos prevalentes dentre todos os estudados.
- Com relação aos sorogrupos O, 52,1% das amostras apresentaram sorogrupos associados a UPEC e SEPEC humanas. Outros sorogrupos estiveram presentes em 13,7% das amostras. 34,2% das amostras apresentaram-se como rugosas (5,5%) ou não-tipáveis (28,8%).
- 15 amostras (20,5%) expressaram hemolisina.
- Nenhuma amostra produziu protease e lecitinase.

- Das 13 amostras estudadas no teste de letalidade em camundongos, seis apresentaram letalidade nula, ou seja, 100% dos camundongos inoculados sobreviveram. Três amostras apresentaram letalidade entre 3 a 8 camundongos. A letalidade total foi conferida para quatro amostras, em que a fímbria P (alelo 2,3 e 3) era prevalente e associada a toxinas como a autotransportadora secretada e o fator necrosante citotóxico do tipo 1.
- O alelo 2 da fímbria P (*papG2*) esteve associado aos genes *fimH* (100%), *iucD* (100%), *fyuA* (100%) e *sat* (80,8%).
- O alelo 3 da fímbria P (*papG3*) associou-se aos genes *fimH* (100%), *fyuA* (100%), *iroN* (87,5%), *hlyA* (100%), *cnf1* (100%) e *usp* (100%).
- O estudo revelou que as amostras *sfaD/E*⁺ continham também, em associação, os seguintes genes de fatores de virulência: *papC* (100%), *fimH* (100%), *fyuA* (100%), *iroN* (90,9%), *hlyA* (90,9%) e *usp* (90,9%).

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arthur M, Campanelli C, Arbeit RD, Kim C, Steinbach S, Johnson CE, Rubin RH, Goldstein R (1989). "Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*." Infect. Immun. **57**: 303-313.
2. Bingen E, Bonacorsi S, Brahimi N, Denamur E, Elion J. (1997). "Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains." J. Infect. Dis. **177**: 642-650.
3. Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S, Terki M, Brahimi N, Loukil C, Barraud D, Bingen E. (2002). "Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains." Infect. Immun. **70**: 3216-3226.
4. Blanco J, Blanco M, Alonso MP, Blanco JE, Garabal JJ, González EA. (1992). "Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2." FEMS Microbiol. Lett. **75**: 155-159.
5. Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Munoz F, Juarez A, Blanco J. (1997). "Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins." Res. Microbiol. **148**(9): 745-755.
6. Bryan, CS. (1989). "Clinical implications of positive blood cultures." Clin. Microbiol. **2**: 329-53.
7. Daigle F, Harel J, Fairbrother J M. (1994). "Expression and detection of *pap*, *sfa*, and *afa* - encoded fimbrial adhesion system among uropathogenic *Escherichia coli*." Clin. J. Microbiol. **40**: 286-291.
8. Davidson, JM. (1987). *Connective Tissue Disease: Molecular Pathology of the Extracellular Matrix*. J. U. a. A. J. Perejda. New York, Dekker: 423.

9. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hartsch T, Gottschalk G, Ron EZ, Fünfstück R, Hacker J. (2001). "S-fimbria-encoding determinant *sfaI* is located on pathogenicity island III₅₃₆ of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536." Infect. Immun. **69**: 4248-4256.

10. Gophna U, Oelschlaeger TA, Hacker J, Ron EZ. (2001). "Yersinia HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts." FEMS Microbiology Letter **196**: 57-60.

11. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HLT. (2000). "Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*." Mol. Microbiol. **38**: 53-56.

12. Hashia R, Kumar R, Vadehra DV. (1981). "Production of phospholipase A and enterotoxin by isolates of *Escherichia coli* from urinary and gastrointestinal tracts." Indian. J. Med. Res. **74**: 656-661.

13. Huang S-H, Chen Y-H, Fu Q, Stins M, Want Y, Wass C, Kim KS. (1999). "Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells." Infect. Immun. **67**: 2103-2109.

14. Huang S-H, Wan Z-S, Chen Y-H, Jong AY, Kim KS. (2001). "Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression." J. Infect. Dis. **183**: 1071-1078.

15. Island MD, Cui X, Foxman B, Marrs CF, Stamm WE, Stapleton AE, Warren JW. (1998). "Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotoxin factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells." Infection and Immunity **66**(7): 3384-3389.

16. Jantunen ME, Siitonen A, Koskimies O, Wikstrom S, Karkkainen UM, Salo I, Saxen H. (2000). "Predominance of class II *papG* allele of *Escherichia coli* in pyelonephritis

in infants with normal urinary tract anatomy." J. Infect. Dis. **181**: 1822-1824.

17. Johanson I-M, Plos K, Marklund B-I, Svanborg C. (1993). "*pap*, *papG* and *prsG* DNA sequences in *Escherichia coli* from the fecal flora and the urinary tract." Microb. Pathog. **15**: 121-129.
18. Johnson JR & Russo TA (2002). "Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections." J. Infect. Dis. **186**: 859-864.
19. Johnson JR & Stell AL (2000). "Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise." J. Infect. Dis. **181**: 261-272.
20. Johnson JR, Brown JJ, Maslow JN. (1998). "Clonal Distribution of the Three Alleles of the Gal(1-4)Gal-Specific Adhesin Gene *papG* among *Escherichia coli* Strains from Patients with Bacteremia." The Journal of Infectious Diseases **177**: 651-661.
21. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA. (2003). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive non-urinary infections." J. Clin. Microbiol. **41**: 5798-5802.
22. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, de Anta MTJ, Vila J. (2005). "Extended Virulence Genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis." The Journal of Infectious Diseases **191**: 46-50.
23. Johnson JR, O'Bryan TT, Kuskowski MA, Maslow JN. (2001a). "Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia." Infect. Immun. **69**: 5363-5374.
24. Johnson JR, Oswald E, O'Bryan TT, Kuskowsky MA, Spanjaard L. (2002). "Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal meningitis in The Netherlands." J. Infect. Dis. **185**:

25. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary Jr. JC, Stell AL. (2000). "Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN_{E. coli}*, among *Escherichia coli* Isolates from patients with urosepsis." Infection and Immunity **68**(5): 3040-3047.
26. Johnson JR, Stell AL, Kaster N, Fasching C, O'Bryan TT. (2001b). "Novel molecular variants of allele I of the *Escherichia coli* P fimbrial adhesin gene *papG*." Infect. Immun. **69**: 2318-2327.
27. Kanamura S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, Ogawa O, Yamamoto S. (2003). "Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan." J. Urol. **170**: 2490-2493.
28. Kanukollu U, Bieler S, Hull S, Hull R. (1985). "Contribution of the *traT* gene to serum resistance among clinical isolates of *Enterobacteriaceae*." J. Med. Microbiol. **19**: 64-67.
29. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat. Rev. Microbiol. **2**: 123-140.
30. Karkkainen U-M, Kauppinen J, Ikaheimo R, Katila M-L, Siitonen A. (1998). "Rapid and specific detection of three different G adhesin classes of P-fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction." J. Microbiol. Methods **34**: 23-29.
31. Kurazono H, Yamamoto S, Nakano M, Nair GB, terai A, Chaicumpa W, Hayashi H. (2000). "Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein." Microb. Pathog. **28**: 183-189.
32. Le Bouguenec C, Garcia ME, Ouin V, Desperrier J-M, Gounon P, Labigne A. (1993).

- "Characterization of plasmid-borne *afa-3* gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains with intestinal or urinary tract infections." Infect. Immun. **61**: 5106-5114.
33. Le Bouguenec C, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, Selvarangan R, Nowicki BJ, Germani Y, Andremont A, Gounon P, Garcia M-I. (2001). "Characterization of Afae adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens." J. Clin. Microbiol. **39**: 1738-1745.
34. Maslow JN, Mulligan ME, Adams KS, Justis JC, Arbeit RD. (1993). "Bacterial adhesins and host factors: role in the development and outcome of *Escherichia coli* bacteremia." Clin. Infect. Dis. **17**: 89-97.
35. Mitsumori K, Terai A, Yamamoto S, Yoshida O. (1998). "Identification of S, F1C and three PapG fimbrial adhesins in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction." FEMS Immunol. Med. Microbiol. **21**: 261-268.
36. Mokady D, Gophna U, Ron EZ. (2005). "Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains." Journal of Clinical Microbiology **43**(1): 66-73.
37. Mulvey MA. (2002). "Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*." Cell. Microbiol. **4**(5): 257-271.
38. Nakano M, Yamamoto S, Terai A, Ogawa O, Makino S, Hayashi H, Nair GB, Kurazono H. (2001). "Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein." FEMS. Microbiol. Letters **205**(1): 71-76.
39. Nilius AM & Savege DC. (1984). "Serum resistance encoded by colicin V plasmids in *Escherichia coli* and its relationship to the plasmid transfer system." Infect. Immun. **43**: 947-953.
40. Oliveira MCBV. (1996). Estudo dos fatores de virulência de cepas de *Escherichia coli*

isoladas de bacteriemias em humanos. Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo, Universidade de São Paulo.

41. Opal SM, Cross AS, Gemski P, Lyhte LW. (1990). "Aerobactin and alpha-hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool." J. Infect. Dis. **161**: 794-796.
42. Ott M, Bender L, Blum G, Schmittroth M, Achtman M, Tschape H, Hacker J. (1991). "Virulence patterns and long-range genetic mapping of extraintestinal *Escherichia coli* K1, K5, and K100 isolates: use of pulsed-field gel electrophoresis." Infect. Immun. **59**(8): 2664-2672.
43. Ott M, Hoschützky H, Jann K, Van Die I, Hacker J. (1988). "Gene clusters for S fimbrial adhesin (*sfa*) and F1C fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function." J. Bacteriol. **170**: 3983-3990.
44. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E. (1999). "The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection." Infect. Immun. **67**(2): 546-553.
45. Pierre G, Chen Y, He L, Blanco JE, Brée A, Schouler C, Huang S, Moulin-Schouler M. (2005). "*ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*." Microbiology **151**: 1179-1186.
46. Pouttu R, Puustinen T, Virkola R, Hacker J, Klemm P, Korhonen TK, 1999. (1999). "Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesins is critical for the adhesiveness of meningitis-associated *Escherichia coli* to collagens." Mol. Microbiol. **31**: 1747-1757.
47. Rippere-Lampe KE, O'Bryan AD, Conran R, Lockman HA. (2001). "Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf(1)*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*." Infect. Immun. **69**: 3954-3964.
48. Russo TA & Johnson JR (2000). "A proposal for an inclusive designation for

- extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC." J. Infect. Dis. **181**(5): 1753-1754.
49. Russo TA, Brown J, Jodush S, Johnson J. (1996). "The O4 specific antigen moiety of lipopolysaccharide but not the K54 group 2 capsule is important for urovirulence in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli*." Infect. Immun. **64**: 2343-2348.
 50. Russo TA, Carlino UB, Johnson JR. (2001). "Identification of *ireA*, a novel iron regulated virulence gene in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*." Infect. Immun. **69**: 6209-6216.
 51. Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Barnard TJ, Johnson JR. (2002). "IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*." Infect. Immun. **70**: 7156-7160.
 52. Russo TA, Wenderoth S, Carlino UB, Merrick JM, Lesse AJ. (1998). "Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT* and *kpsE* from an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (CP9, O4/K54/H5)." J. Bacteriol. **180**: 338-349.
 53. Sakarya S, Ertem GT, Oncu S, Kocak I, Erol N, Oncu S. (2003). "*Escherichia coli* bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence." FEMS Immunol. Med. Microbiol. **39**(1): 45-50.
 54. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory, c1989.
 55. Saren A, Virkola R, Hacker J, Korhonen TK. (1999). "The cellular form of human fibronectin as an adhesion target for the S fimbriae of meningitis-associated *Escherichia coli*." Infect. Immun. **67**(5): 2671-2676.
 56. Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J. (1998). "Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans." Infect. Immun. **66**: 480-485.

57. Scott DA & Kaper JB. (1994). "Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin." Infect. Immun. **62**: 244-251.
58. Senior DF, deMan P, Svanborg C. (1992). "Serotype, hemolysin production, and adherence characteristics of strains of *Escherichia coli* causing urinary tract infection in dogs." Am. J. Vet. Res. **53**: 494-498.
59. Simi S. (2004). Caracterização físico-química e biológica de uma hemolisina de baixo peso molecular produzida por linhagem clínica de *Enterobacter cloacae*. Instituto de Biologia. Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
60. Sokurenko EV, Chesnokova V, Doyle RJ, Hasty DL. (1997). "Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. Differential binding to mannosides and uroepithelial cells." J. Biol. Chem. **272**: 17880-17886.
61. Stapleton AE, Stroud MR, Hakomori SI, Stamm WE. (1998). "The globoseries glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside is found in urinary tract tissues and is a preferred binding receptor in vitro for uropathogenic *Escherichia coli* expressing *pap*-encoded adhesins." Infect. Immun. **66**: 3856-3861.
62. Stroud MR, Stapleton AE, Levery SB. (1998). "The P histo-blood group-related glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside as a preferred binding receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: isolation and structural characterization from human kidney." Biochemistry **37**: 17420-17428.
63. Swenson DL, Bukanov NO, Berg DE, Welch RA. (1996). "Two pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing." Infect. Immun. **64**: 3736-3743.
64. Tiba MR. (2003). Determinação genotípica dos fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de cistite. Instituto de Biologia. Campinas, Universidade Estadual de Campinas.

65. Torres AG, Redford P, Welch RA, Payne SM. (2001). "TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse." Infect. Immun. **69**: 6179-6185.
66. Vandekerchove D, Vandemaele F, Adriaensen C, Zaleska M, Hernalsteens J, De Baets L, Butaye P, Van Immerseel F, Wattiau P, Laevens H, Mast J, Goddeeris B, Pasmans F. (2005). "Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: Comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks." Veterinary Microbiology **108**: 75-87.
67. Welch R, Burland V, Plunkett GR, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Connenberg MS, Blattner FR. (2002). "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 17020-17024.
68. Welch RA, Dellinger EP, Minsheu B, Falkow S. (1981). "Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *Escherichia coli* infections." Nature **294**: 665-667.
69. Wilson ML. (1994). "Blood cultures." Introduction. Clin. Lab. Med. **14**(1): 1-7.
70. Wooley RE, Nolan LK, Brown J, Gibbs PS, Bounous DI. (1994). "Phenotypic expression of recombinant plasmids pKT107 and pHK11 in an avirulent avian *Escherichia coli*." Avian Dis. **38**: 127-134.
71. Yabuuchi E. (1997). Bacilos Gram-negativos fermentadores. Tokyo, Japão, Igakushoin.
72. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurozono H, Takeda Y, Yoshida O. (1995). "Detection of urovirulence factor in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction." FEMS. Immun. Med. Microbiol. **12**: 85-90.
73. Zhang L, Foxman B, Tallman P, Cladera E, Le Bouguenec C, Marrs CF. (1997). "Distribution of *drb* genes coding for Dr binding adhesins among uropathogenic and

fecal *Escherichia coli* isolates and identification of new subtypes." Infect. Immun. **65**: 2011-2018.