Jonatas William Silva

Análise do potencial uropatogênico de *Escherichia coli* enteroagregativa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

Jonatas William Silva

Análise do potencial uropatogênico de *Escherichia coli* enteroagregativa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva, Jonatas William
Análise do potencial uropatogênico de Escherichia coli enteroagregativa / Jonatas William Silva; orientador Dr. Waldir Pereira Elias Junior. -- São Paulo, 2019.
93 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Escherichia coli. 2. Infecções bacterianas. 3. Virulência. 4. Infecções urinárias. I. Pereira Elias Junior, Dr. Waldir , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jonatas William Silva

Titulo da Dissertação/Tese: Análise do potencial uropatogênico de *Escherichia coli* enteroagregativa

Orientador: Waldir Pereira Elias Júnior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Análise do potencial uropatogênico de Escherichia coli enteroagregativa***", registrado sob o protocolo nº ***88/2017***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***03/10/2017*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Waldir Pereira Elias Júnior***
- Departamento: *Microbiologia*
- Membros da Equipe: *Jonatas William Silva (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *ww2.icb.usp.br/icb/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Analysis of the uropathogenic potential of enteroaggregative Escherichia coli***", protocol nº ***88/2017***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***10/3/2017*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Waldir Pereira Elias Júnior***
- Team members: *Jonatas William Silva (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*Balb/c*	*Fêmea/female*	*6-10 semanas/weeks*	*36*

São Paulo, 18 de outubro de 2017.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.010.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **88/2017/CEUA**, aprovado em 03/10/2017, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "***Análise do potencial uropatogênico de Escherichia coli enteroagregativa***", de responsabilidade do Prof. Dr. **Waldir Pereira Elias Júnior**, do Departamento de Microbiologia, para melhor processamento estatístico dos dados, bem como mudança de linhagem:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Camundongo	C57BL/6	Fêmeas	6-10 semanas	60

São Paulo, 20 de fevereiro de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.076.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **88/2017/CEUA**, aprovado em 03/10/2017, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo ***"Análise do potencial uropatogênico de Escherichia coli enteroagregativa"***, de responsabilidade do Prof. Dr. **Waldir Pereira Elias Júnior**, do Departamento de Microbiologia, para melhor processamento estatístico dos dados, bem como mudança de linhagem:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus Musculus	C57/BL6	Fêmea/female	6-10 semanas/Weeks	20

São Paulo, 30 de abril de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.116.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **88/2017/CEUA**, aprovado em 03/10/2017, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo ***"Análise do potencial uropatogênico de Escherichia coli enteroagregativa"***, de responsabilidade do Prof. Dr. **Waldir Pereira Elias Júnior**, do Departamento de Microbiologia, para melhor processamento estatístico dos dados, bem como mudança de linhagem:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus Musculus	C57/BL6	Fêmea/female	6-10 semanas/Weeks	10

São Paulo, 04 de julho de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho a meus pais pelo incansável apoio que me deram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de concluir mais uma etapa importante em minha vida. Em todo tempo Ele tem me abençoado e me guiado.

Agradeço aos meus pais Jessé Bernardes da Silva e Claudia Lucia de Andrade Silva por terem sempre me apoiado e não terem medidos esforços para me ajudar nessa vida longe de casa. Vocês são um grande exemplo para mim, agradeço a Deus por ter vocês.

Ao Dr. Waldir P. Elias Jr. por ter aberto as portas para mim no laboratório de bacteriologia do Instituto Butantan. Obrigado por me ensinar tantas coisas, com certeza você é um exemplo para mim e para todos seus alunos e amigos. Obrigado por toda paciência e companheirismo nesses 3 anos e meio de trabalho.

Às professoras Dra. Rosa Maria Silva e Tânia A. Tardelli Gomes do Amaral pela colaboração e ajuda prestada no projeto. A Doutora Cideli Coelho, pelo auxílio com o planejamento e execução do modelo animal.

Faço um agradecimento especial novamente ao meu orientador Dr. Waldir, à Dra. Cecilia Mari Abe e ao meu amigo Paulo Alfonso, por terem prestado uma grande ajuda durante os experimentos, em especial aos experimentos animais.

Aos meus colegas de bancada Claudia Trigo, Claudia Freire, Paulo, Roberto e Fernanda pela ajuda sempre que precisei.

A minha irmã Jéssica Daiane, e ao meu sobrinho querido Miguel por todo apoio e incentivo. Também agradeço a todos os demais membros da minha família. Amo vocês.

A minha namorada, Andressa, por estar ao meu lado sempre, me ajudando no que for necessário, por cuidar e amar. Obrigado por tudo, amo você.

Enfim, a todos os amigos, funcionários e pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan que de alguma forma contribuíram para mais essa conquista.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTO A AGÊNCIA DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil) com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo n°2018/06610-9.

RESUMO

SILVA, J. W. **Análise do potencial uropatogênico de *Escherichia coli* enteroagregativa.** 2019. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é um dos patótipos de *E. coli* que causam diarreia. EAEC também tem sido associada a casos de infecção do trato urinário (ITU) nos últimos anos. De fato, um subgrupo de cepas fecais de EAEC está inserido nos mesmos grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) carreando marcadores de EAEC, dessa forma apresentando correlação filogenética. Esses dados apontam para a possibilidade de que pelo menos um subgrupo de cepas de EAEC tenha potencial uropatogênico. Devido a esses fatos, o objetivo do presente estudo foi determinar as propriedades uropatogênicas de cepas de EAEC que possuem marcadores genéticos de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). Para esse fim foram selecionadas 33 EAEC apresentando marcadores genéticos de ExPEC (EAEC/ExPEC+), isto é, a presença de pelo menos dois dos genes *afa*/*dra*, *iutA*, *sfa*/*foc*, *kpsMTII* e *papA*/*papC*. Para fins comparativos também foram selecionadas 11 cepas de EAEC sem esses marcadores (EAEC/ExPEC-) e 18 cepas de UPEC. Inicialmente, todas as cepas foram testadas quanto à capacidade de aderência nas células da linhagem 5637 (bexiga humana) e HEK293 (rim embrionário humano). Os ensaios realizados com células de bexiga mostraram que 82% das cepas analisadas eram aderentes, 12% causaram destacamento celular e 6% não aderiram; enquanto os ensaios realizados com células renais mostraram que 88% eram aderentes e 12% causaram descolamento celular. Houve semelhança entre os perfis das linhagens EAEC/ExPEC+ e UPEC, onde o descolamento celular foi verificado. As cepas citodestacantes apresentaram atividade α-hemolítica detectada em ágar sangue de carneiro. A presença da fímbria tipo 1 foi investigada indiretamente pela aglutinação de *Saccharomyces cerevisiae*. A aglutinação foi detectada em 66,1% de todas as cepas e esse fenótipo foi inibido pela presença de D-manose a 2%, indicando a expressão da fímbria tipo 1 na maioria das cepas estudadas, sem diferenças entre os grupos de cepas. A produção de biofilme em poliestireno também foi avaliada na presença e ausência de 1% de metil α-D-manopiranósido (α-D-man) e observou-se que no grupo das EAEC/ExPEC+ a formação de biofilme foi detectada em 60,6% das cepas e esse fenótipo não foi inibido pelo α-D-man, sugerindo que outras adesinas, além da fímbria tipo 1, podem estar envolvidas na produção de biofilme por essas cepas. Um modelo de ITU ascendente com camundongos C57BL/6 foi realizado para investigar a capacidade uropatogênica das cepas. Todas as cepas EAEC/ExPEC+ avaliadas foram capazes de causar ITU nesse modelo, enquanto apenas uma cepa EAEC/ExPEC- causou ITU. Não houve associação entre a capacidade de causar ITU e os fatores de virulência de EAEC e UPEC pesquisados. Por fim, conclui-se que cepas fecais de EAEC com *background* genético contendo marcadores de ExPEC são capazes de colonizar o uroepitélio de forma mais eficiente e assim ocasionar cistite e pielonefrite em camundongos C57BL/6. Dessa forma, cepas de EAEC fecais que possuem essas combinações de genes apresentam potencial uropatogênico.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Infecções bacterianas. Virulência. Infecções urinárias

ABSTRACT

SILVA, J. W. **Analysis of uropathogenic potential of enteroagregative *Escherichia coli***. 2019. 93 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is one of the *E. coli* pathotypes that cause diarrhea. In the last years, EAEC has also been associated with cases of urinary tract infection (UTI). In fact, a subgroup of fecal EAEC strains is inserted in the same phylogenetic groups of uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains carrying EAEC markers, thus showing phylogenetic correlation. These data pointed out to the possibility that at least one subgroup of EAEC strains has uropathogenic potential. In view of these facts, the aim of the present study was to determine the uropathogenic properties of EAEC strains that have genetic markers of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). For this purpose, 33 EAEC with ExPEC genetic markers (EAEC/ExPEC+), that is, the presence of at least two of the genes *afa/dra*, *iutA*, *sfa/foc*, *kpsMTII* and *papA/papC*, were selected For comparative purposes, 11 EAEC strains without these markers (EAEC/ExPEC-) and 18 UPEC strains were also selected. Initially, all strains were tested for adherence in the 5637 (human bladder) and HEK293 (human embryonic kidney) cells. Assays performed with bladder cells showed that 82% of the strains analyzed were adherent, 12% caused cell detachment and 6% did not adhere; whereas renal cell assays showed that 88% were adherent and 12% caused cell detachment. There was similarity between EAEC/ExPEC+ and UPEC profiles, where cell detachment was verified. The strains that provoked cell detachment showed α-hemolytic activity, detected in sheep blood agar. The presence of type 1 fimbria was investigated indirectly by agglutination of *Saccharomyces cerevisiae*. Agglutination was detected in 66.1% of all strains and this phenotype was inhibited by the presence of 2% D-mannose, indicating the expression of type 1 fimbria in most of the studied strains, with no differences between the groups of strains. Biofilm production in polystyrene was also evaluated in the presence and absence of 1% methyl α-D-mannopyranoside (α-D-man). It was observed that in the EAEC/ExPEC+ group biofilm formation was detected in 60.6% of the strains and this phenotype was not inhibited by α-D-man, suggesting that adhesins other than type 1 fimbria may be involved in biofilm production by these strains. A model of ascending UTI with C57BL/6 mice was performed to investigate the uropathogenic capacity of the strains. All EAEC/ExPEC+ strains evaluated were able to cause UTI in this model; while only one EAEC/ExPEC- strain caused UTI. There was no association between the ability to cause UTI and the EAEC and UPEC virulence factors investigated. In conclusion, fecal EAEC strains with a genetic background containing ExPEC markers are able to colonize the uroepithelium more efficiently and, therefore, cause cystitis and pyelonephritis in C57BL/6 mice. Thus, fecal EAEC strains that harbor these gene combinations have uropathogenic potential.

Keywords: *Escherichia coli*. Bacterial infections. Virulence. Urinary infections.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Padrão de adesão agregativo de EAEC.....24

Figura 2- Esquema da patogênese de EAEC evidenciando os fatores de virulência identificados principalmente em EAEC 042.....27

Figura 3- Principais fatores de virulência de ExPEC 31

Figura 4- Esquema dos estágios da infecção do trato urinário por UPEC.....33

Figura 5- Filograma e características genéticas de cepas EAEC com marcadores de ExPEC e UPEC com e sem marcadores de EAEC.....37

Figura 6- Prevalência do gene *agg5A* entre as cepas deste estudo 54

Figura 7- Perfis de adesão observados no ensaio de adesão após 3 h de incubação com as linhagens celulares 5637 (bexiga) e HEK-293 (rins) na ausência de manose 56

Figura 8- Presença de α-hemolisina em algumas cepas após 3 h de incubação em ágar sangue de carneiro suplementado com cloreto de cálcio.....58

Figura 9- Leituras das densidades ópticas nos testes de formação de biofilme em poliestireno, após cultivo em DMEM alta glicose por 24 h a 37 °C [a].....62

Figura 10- Contagens de UFC/g de tecidos (bexigas e rins) após inoculação intravesical de cepas de EAEC/ExPEC+ e EAEC/ExPEC- em camundongos C57BL/6 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cepas selecionadas para os experimentos de ITU em camundongos C57BL/6 49

Tabela 2- Sequências dos iniciadores, tamanhos dos amplicons e temperaturas de anelamento das PCR para confirmação da identidade das cepas recuperadas nos rins e bexigas nos experimentos de ITU em camundongos C57BL/6.....51

Tabela 3- Perfil genético relacionado à biogênese das fímbrias AAF apresentado pelas cepas positivas para *agg5A*.....54

Tabela 4- Ensaios de adesão realizados com as linhagens celulares 5637 e HEK-293, após 3 h de incubação bactérias-células na ausência de manose.....57

Tabela 5- Prevalência de α-hemolisina entre os diferentes grupos de cepas.....59

Tabela 6- Presença da fímbria tipo 1 entre os diferentes grupos de cepas analisadas no ensaio de aglutinação de levedura.....60

Tabela 7- Capacidade de formação de biofilme em poliestireno após cultivo em DMEM alta glicose por 24 h a 37 °C 61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 *Escherichia coli* 18
1.2 *E. coli* como agente de infecções 19
1.3 EAEC como agente de infecções do trato urinário 34
2. OBJETIVOS 39
2.1 Objetivo geral 39
2.2 Objetivos específicos 39
3 MATERIAIS E MÉTODOS 40
3.1 Cepas bacterianas 40
3.2 Reação em cadeia da polimerase (técnica de PCR) 41
3.3 Eletroforese em gel de agarose 41
3.4 Pesquisa dos genes *agg5A* e *cnf1* 42
3.5 Cultivo das linhagens celulares 43
3.6 Ensaio de adesão 43
3.7 Ensaio de produção de hemolisinas 44
3.8 Análise da presença de fímbria tipo 1 45
3.9 Teste de capacidade de formação de biofilme 45
3.10 Modelo de infecção ascendente do trato urinário 46
3.11 Análise estatística 52
4 RESULTADOS 53
4.1 Pesquisa dos genes *agg5A* e *cnf1* entre cepas deste estudo 53
4.2 Adesão em células humanas de bexiga e rim cultivadas 55
4.3 Produção de hemolisinas 58
4.4 Detecção fenotípica da fímbria tipo 1 entre as cepas deste estudo 59
4.5 Capacidade de formação de biofilme 60
4.6 Colonização da bexiga e rins no modelo murino de ITU 63
DISCUSSÃO 67
6 CONCLUSÕES 79
REFERÊNCIAS 80

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo assim um micro-organismo bacilar, Gram negativo, não esporulante, anaeróbio facultativo, que coloniza o trato intestinal de animais de sangue quente e de humanos, permanecendo como comensal durante toda a vida do indivíduo (JOHNSON; RUSSO, 2005; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005; TENAILLON et al., 2010).

Embora a maioria das cepas de *E. coli* circulantes sejam comensais e não causem nenhum dano ao hospedeiro, com exceção de pacientes imunocomprometidos e/ou quando a barreira gastrointestinal é rompida, alguns clones de *E. coli* possuem fatores de virulência variados que lhes conferem a habilidade de colonizar novos sítios e causar um amplo espectro de doenças intestinais e extraintestinais. Estes fatores geralmente são codificados em elementos genéticos móveis como ilhas de patogenicidade, sequências de inserção ou plasmídeos, o que facilita a formação de novas combinações de fatores de virulência que podem vir a ser parte integrante do genoma bacteriano (CROXEN; FINLAY, 2010; GOMES et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Em *E. coli*, combinações de diferentes fatores de virulência persistiram entre as linhagens, levando ao reconhecimento de diferentes patótipos de *E. coli*. As infecções causadas pelos diferentes patótipos de *E. coli* podem resultar em três condições clínicas comuns: diarreia/disenteria, infecção do trato urinário (ITU) e sepse/meningite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Ao estudar populações bacterianas utilizando-se *E. coli* como protótipo, Whittam, Ochman e Selander (1983) descreveram estruturas genéticas denominadas filogrupos, os mesmos eram divididos inicialmente em 4 grupos, sendo os mesmos A, B1, B2 e D. Com base nesses dados, Clermont et al. (2000) desenvolveram uma reação em cadeia de polimerase (PCR) para classificar filogeneticamente cepas de *E. coli,* sendo que por este método as cepas virulentas, principalmente cepas de *E. coli* extraintestinais, geralmente classificavam-se no filogrupo B2, podendo algumas

serem classificadas no filogrupo D, enquanto que cepas comensais e cepas de *E. coli* diarreiogênicas eram encontradas nos filogrupos A e B1 (HERZER et al., 1990; LECOINTRE et al., 1998; SABATÉ et al., 2006).

A técnica descrita por Clermont et al. (2000) foi aprimorada em estudos posteriores do mesmo grupo. Na nova abordagem as cepas podem ser classificadas em oito filogrupos conhecidos atualmente (filogrupos A, B1, B2, C, D, E, F e G). Com o uso desta técnica foi possível observar que cepas de ExPEC são mais comumente encontradas nos filogrupos B2, D e F e cepas de DEC e comensais são comumente encontradas nos filogrupos A, B1, C e E. Com o acúmulo de dados de genoma completo, ficou claro que algumas linhagens pertenciam a um grupo intermediário entre os grupos F e B2, dando origem assim o filogrupo G. Esta abordagem deixou claro que cepas de diversos filogrupos diferem em características fenotípicas e genotípicas, nicho ecológico e habilidade em causar doenças (ALM et al., 2011; CLERMONT et al., 2013; CLERMONT et al., 2019; TENAILLON et al., 2010).

1.2 *E. coli* como agente de infecções

De acordo com grupos de determinantes de virulência adquiridos, foram formadas combinações específicas definindo-se os grupos de *E. coli* que são coletivamente conhecidos como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e *E. coli* extraintestinais (ExPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RUSSO; JOHNSON, 2000).

E. coli diarreiogênicas, ou DEC, causam infecções intestinais por desregularem as funções normais do intestino, provocando assim a diarreia ou disenteria. Podem causar estes danos de diversas maneiras, de acordo com o seu arcabouço genético de fatores de virulência. Na diarreia induzida por bactérias ocorre a rápida perda de fluidos e eletrólitos, resultado da inibição da absorção normal do intestino, assim como a ativação de processos de secreção (BLASER; DEANE; FRUHWALD, 2015; INGERSON-MAHAD; REID, 2011; VISWANATHAN; HODGES; HECHT, 2008). Nos processos invasivos, os danos na mucosa intestinal induzem grande processo inflamatório com perda de sangue nas fezes, o que caracteriza a disenteria (GOMES et al., 2016).

A diarreia é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a causa estimada de 1,3 milhões de mortes por ano (GBD, 2017; WHO, 2018). É a segunda maior causa de mortalidade infantil no mundo. No ano de 2017 causou 424 mil mortes em crianças de até 5 anos (WHO, 2018). Em regiões onde as gastroenterites são endêmicas, como em países da África e do sudoeste asiático, 25% das mortes na infância são causadas por gastroenterites virais agudas (SIDOTI et al., 2015).

Devido à alta mortalidade causada pela diarreia, existem iniciativas governamentais estipuladas pela *United Nations Chidren´s* (UNICEF) e *World Health Organization* (WHO) para prevenir a doença, como por exemplo as políticas de combate à desnutrição crônica, à falta de saneamento básico e à falta de acesso à água potável (FISCHER et al., 2012).

Até o ano de 2011, 71,8% dos municípios brasileiros não possuíam uma política municipal de saneamento básico (IBGE, 2011). No ano de 2017, 41,5% dos 5.570 municípios brasileiros afirmaram possuir Plano Municipal de Saneamento Básico (IBGE, 2018). A situação do saneamento básico precário no país está melhorando a cada ano, porém nos municípios do Norte os números ainda são preocupantes, onde apenas 450 municípios dessa região apresentam um Plano Municipal de Saneamento Básico (IBGE, 2018), o que impacta no risco de casos de doenças gastrointestinais infecciosas.

Repetidas crises diarreicas em crianças contribuem significantemente para deficiências de crescimento e comprometem parte do condicionamento físico, cognição e escolaridade (GUERRANT et al., 2013). Estima-se que diarreias recorrentes nos primeiros dois anos de idade podem contribuir com a perda de 10 pontos no quociente de inteligência (Q.I.) e um ano de escolaridade até os nove anos de idade (KEUSCH et al., 2013; PETRI et al., 2008; WHO, 2015).

Em contraste com outros patógenos entéricos, como *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., o diagnóstico das cepas de DEC no curso da infecção é bastante complexo, isto porque grande parte das cepas causadoras de diarreia são bioquimicamente idênticas às *E. coli* comensais e a diferenciação necessita de infraestrutura laboratorial muito especializada (ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

A diversidade patogênica de DEC compreende pelo menos seis categorias ou patótipos, os quais causam infecção intestinal de diferentes maneiras. Os patótipos de DEC diferem em relação aos seus locais preferenciais de colonização do hospedeiro, mecanismos de virulência, sintomas clínicos e consequências causadas. Os patótipos são classificados como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998).

Outro patótipo de DEC foi descrito como *E. coli* difusamente aderente (DAEC), o qual compreende cepas que aderem às células epiteliais cultivadas em uma distribuição característica, denominada adesão difusa. Apesar de sua classificação como um grupo distinto dos outros patótipos, a designação de DAEC como um diferente patótipo de DEC requer mais estudos epidemiológicos, que foram dificultados pela complexidade na sua identificação e classificação (CROXEN, et al., 2013). Diferentemente dos outros patótipos, onde cepas verdadeiramente patogênicas foram identificadas em surtos e/ou estudos em voluntários, a patogenicidade da categoria DAEC permanece questionável (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998).

E. coli enteropatogênica (EPEC) é um importante agente etiológico de diarreia infantil em muitos países em desenvolvimento, por conta de sua alta prevalência na comunidade e em ambientes hospitalares (OCHOA; CONTRERAS, 2011).

Originalmente identificadas pela determinação dos antígenos somático (O) e flagelar (H), técnica conhecida como sorotipagem, cepas de EPEC são agora definidas como *E. coli* com a capacidade de causar diarreia, produzir uma histopatologia no epitélio intestinal, conhecida como lesão *attaching-effacing* (lesão A/E), e pela incapacidade de produzir toxina Shiga (Stx) e enterotoxinas termolábil (LT) ou termoestável (ST) (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998).

Com a melhorias nas técnicas que permitem uma melhor compreensão do genoma e mecanismos e virulência entre as estirpes de EPEC ao longo dos anos tornou-se possível à subclassificação de EPEC em EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC) (HERNANDES et al., 2009; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). As cepas tEPEC causadoras de diarreia em

humanos possuem um grande plasmídeo de virulência conhecido como "*EPEC adherence factor plasmid"* (pEAF), que codifica a fímbria tipo IV chamada de "*bundle-forming pilus"* (BFP), enquanto aEPEC não possui este plasmídeo (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

As cepas de tEPEC caracterizam-se pelo padrão de adesão localizada (AL) na superfície de células HeLa ou HEp-2, apresentando-se como microcolônias compactas aderidas às células após três horas de contato. Já as cepas de aEPEC podem apresentar um padrão de aderência semelhante a tEPEC, porém com microcolônias mais frouxas, denominado adesão localizada-*like* (AL-L), o qual pode ser observado após seis horas de contato com as células epiteliais (RODRIGUES et al., 1996; SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984; SCALETSKY et al., 1999).

EHEC/STEC representam um grupo bem conhecido de patógenos de origem alimentar distribuídos mundialmente. A capacidade de produzir uma ou mais citotoxinas da família da toxina Shiga (Stx) constitui o principal atributo de virulência desse patógeno de *E. coli* (MELTON-CELSA, 2014). As doenças causadas por este patótipo continuam sendo um grande problema de saúde pública em todo o planeta. As manifestações clínicas da infecção por EHEC/STEC incluem a diarreia sanguinolenta, a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (AMORIM et al., 2014; CROXEN et al., 2013).

Stx pode ser classificada em dois tipos: Stx1 e Stx2, incluindo subtipos e variantes dos subtipos (SCHEUTZ, 2014). Os sorogrupos mais relacionados a doenças são conhecidos como "*big six*" e compreendem os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (BROOKS et al., 2005).

O principal reservatório destas cepas é o trato intestinal de bovinos, e os surtos causados por elas foram inicialmente associados ao consumo de hambúrgueres malcozidos. As cepas do sorogrupo O157:H7 são as mais conhecidas, e foram responsáveis por um surto que teve origem em uma rede de lanchonete (CROXEN et al., 2013; INGERSON-MAHAD; REID, 2011; RILEY et al., 1983).

As cepas de ETEC são caracterizadas pela produção de fatores de colonização (CFs) e pelo menos uma das duas enterotoxinas: LT e ST. A ETEC representa uma das causas mais comuns de diarreia em crianças em países em desenvolvimento e

em viajantes para essas regiões endêmicas. ETEC também é a causa de prejuízos econômico para os agricultores e a indústria, onde é um importante patógeno para frangos, suínos e gado de corte (GOMES et al., 2016).

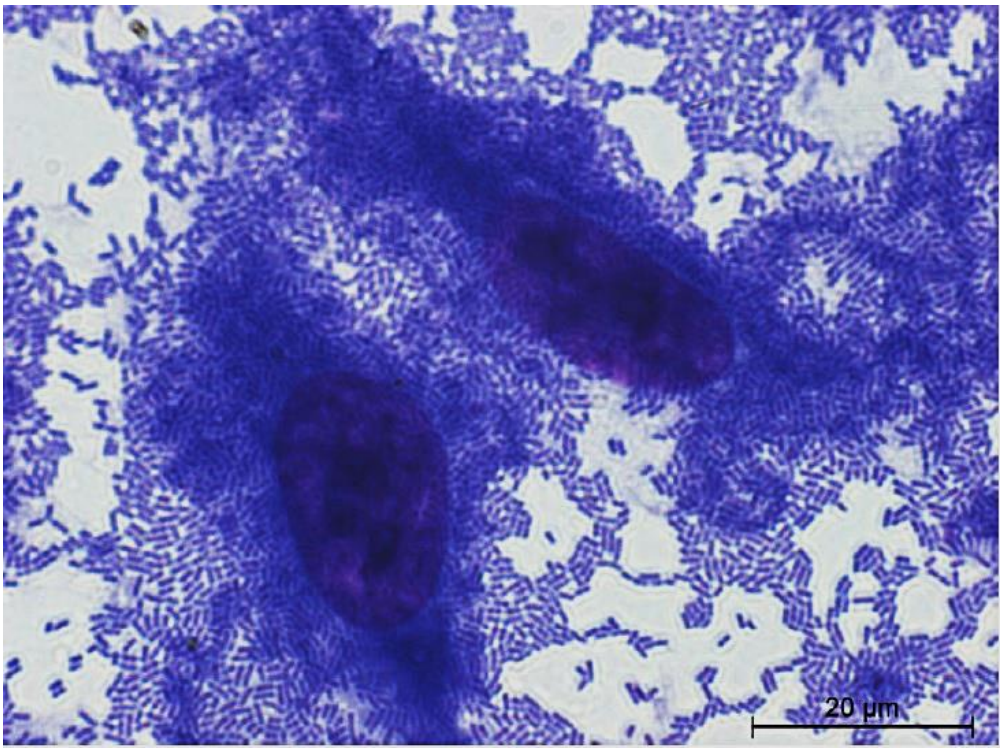
Logo após a aderência à mucosa intestinal, as cepas de ETEC produzem as enterotoxinas LT e ST. Ambos os tipos de toxinas medeiam a desregulação dos canais iônicos na membrana epitelial, levando à perda de íons e grandes quantidades de água, levando a diarreia aquosa característica causada por essas cepas bacterianas (FLECKENSTEIN et al., 2010).

Cepas de EIEC são bioquímica, genética e patogenicamente relacionadas a *Shigella spp*. Estas bactérias são taxonomicamente indistinguíveis no nível de espécie, mas, levando em conta a significância clínica de *Shigella*, a nomenclatura distinta foi mantida. Este patótipo é um patógeno intracelular facultativo e é o agente etiológico da disenteria bacilar (PUPO; LAN; REEVES, 2000; WEI et al., 2003).

EIEC apresenta virulência reduzida quando comparada a *Shigella*, incluindo expressão reduzida dos fatores de virulência, baixa eficiência ao destruir macrófagos, baixo índice de espalhamento célula-célula e baixa indução de resposta pró-inflamatória, o que leva a uma doença menos severa (BANDO et al., 2010; MORENO et al., 2009; MORENO et al., 2012). A adaptação de EIEC para se tornar um patógeno intracelular deriva basicamente da aquisição de um plasmídeo de invasão, conhecido como pINV (CROXEN et al., 2013). As infecções por EIEC são pouco frequentes, mesmo em países subdesenvolvidos (KOTLOFF et al., 2013).

EAEC é definida como o patótipo de DEC que apresenta o padrão de adesão agregativo (AA) em células epiteliais cultivadas (NATARO et al., 1987; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998). No padrão AA (Figura 1) as bactérias formam agregados que se assemelham a tijolos empilhados, aderindo à superfície das células eucarióticas, bem como à superfície da lamínula, em arranjos análogos a favos de colmeia (GOMES et al., 2016).

Figura 1- Padrão de adesão agregativo de EAEC



Reproduzido de Andrade, (2019).
Padrão AA em células HEp-2 após 6 h de incubação da cepa de EAEC BA732 evidenciado pela presença de bactérias agregadas e aderidas na superfície da lamínula e também das células. Coloração com May-Grünwald e Giemsa.

Esse padrão foi descrito durante a análise da aderência em células HEp-2 de cepas de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância, conduzido no Chile (NATARO et al., 1987). A alta prevalência do padrão AA em cepas de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia, levou à proposição do novo patótipo de DEC, denominado *E. coli* enteroagregativa ou EAggEC (NATARO et al., 1987). Posteriormente a literatura da área adotou a abreviatura EAEC e EAggEc entrou em desuso (HEBBELSTRUP JENSEN, 2014; NATARO; KAPER, 1998).

Dentre os patótipos de *E. coli* diarreiogênica, EAEC se destaca por ser detectada em estudos epidemiológicos ao redor do mundo, apresentando-se como um dos principais enteropatógenos emergentes. Crianças e adultos que vivem em países em desenvolvimento assim como turistas que visitam países em desenvolvimento são susceptíveis a infecções por EAEC, as quais podem resultar em infecção persistente. Apesar de sua alta prevalência, a patogênese de EAEC ainda é pouco conhecida em comparação às outras categorias de *E. coli* diarreiogênicas

(HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Vários surtos de gastroenterites causados por EAEC foram relatados em países de baixa e alta renda econômica, envolvendo um alto número de crianças ou adultos, cuja infecção foi associada ao consumo de alimentos contaminados. Surtos no Reino Unido (DALLMAN et al., 2014), Japão (ITOH et al., 1997) e Itália (SCAVIA et al., 2008) são exemplos que demonstram a relevância da infecção de EAEC nos países desenvolvidos. No Reino Unido, após um festival de comidas típicas foram reportados 413 casos de diarreia persistente. Em um dos surtos japoneses, 2.697 crianças em idade escolar foram afetadas após o consumo de lanches escolares (ITOH et al., 1997). Na Itália, os surtos foram transmitidos por queijo não pasteurizado (SCAVIA et al., 2008). A EAEC também foi responsável por surtos em países em desenvolvimento como o que ocorreu em Niš, Servia, onde 16 recém-nascidos e três crianças tiveram diarreia, febre e perda de peso (COBELJIC et al., 1996).

Uma cepa de *E. coli* (sorotipo O104:H4) causou um grande surto de diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica urêmica e em vários países da Europa em 2011, onde pôde ser observada uma rara combinação de características típicas de EAEC juntamente com a capacidade de produzir a toxina Stx, característica de STEC (SCHEUTZ et al., 2011). Essa cepa foi amplamente estudada e seu genoma mostrou que correspondia à cepa de EAEC O104:H4 (cepa 55989) que adquiriu o fago que codifica Stx e plasmídeos de virulência (NAVARRO-GARCIA, 2015).

O padrão AA demonstrado no teste de adesão em células HeLa ou HEp-2 é usado como diagnóstico padrão (*gold standard*) para a classificação de EAEC (NATARO; KAPER, 1998), uma vez que ainda não foi encontrado um determinante genético comum para todas cepas deste patótipo (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Nos últimos anos, diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos como alternativa ao ensaio de adesão, o qual é caro, consome tempo e requer cultura de células e infraestrutura adequada (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

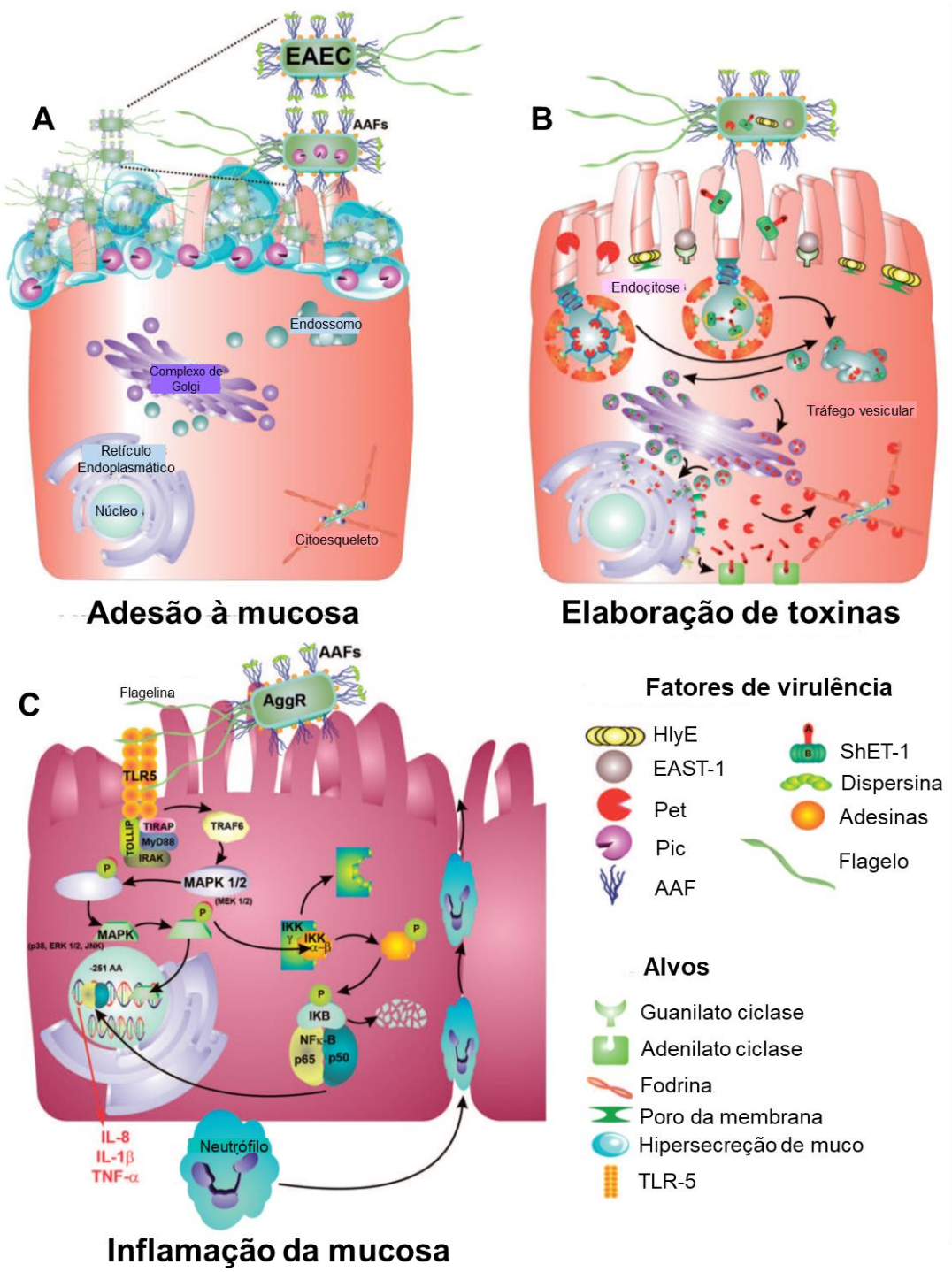
A estratégia básica de infecção por EAEC resume-se na colonização da mucosa intestinal seguida pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas e indução de processo inflamatório (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). EAEC aumenta

significantemente a secreção de muco, envolvendo as bactérias em um biofilme, o que pode estar relacionado à habilidade de colonização e de promover diarreia persistente (NATARO; KAPER, 1998). A Figura 2 apresenta as etapas da patogênese de EAEC indicando os principais fatores de virulência envolvidos em cada etapa.

Sarantuya et al. (2004) propuseram a classificação de EAEC em grupos de típica e atípica, de acordo com a presença ou não do gene *aggR*, o qual codifica uma proteína reguladora global dos genes de virulência de EAEC e está localizado no plasmídeo de virulência comumente presente em cepas deste patótipo (BAUDRY et al., 1990).

A cepa EAEC 042, que causou diarreia em um estudo em voluntários (NATARO et al. 1995), tornou-se a cepa EAEC protótipo para o estudo dos fatores de virulência e patogenicidade da EAEC. A 042 alberga um plasmídeo de ~100 kb denominado pAA2 (CZECZULIN et al., 1999). Nesse plasmídeo estão presentes diversos genes de virulência que têm a expressão regulada por AggR (CHAUDHURI et al., 2010; ELIAS et al., 1999; NAVARRO-GARCIA et al., 2010). Os primeiros fatores de virulência a serem identificados em EAEC foram as fímbrias de adesão agregativa ou AAFs, seguidas por uma ampla gama de fatores funcionalmente distintos, incluindo as toxinas plasmideais Pet e EAST-1; a toxina ShET1 codificada cromossomicamente; Pic, uma mucinase amplamente associada a *E. coli* patogênica e *Shigella sp*.; uma proteína secretada chamada dispersina, que se liga ao LPS neutralizando assim a carga negativa da célula; e mais recentemente a um novo sistema de secreção do tipo VI (DUDLEY et al. 2006; ESLAVA et al*.,* 1998; HARRINGTON et al*.* 2005; HENDERSON et al*.,* 1999, NATARO et al*.,* 1995; SHEIK et al*.,* 2002; WANKE et al*.*, 1998).

Figura 2- Esquema da patogênese de EAEC evidenciando os fatores de virulência identificados principalmente em EAEC 042



Adaptado de Navarro-Garcia e Elias (2011).

Modelo de 3 estágios para a infecção por EAEC na mucosa intestinal. (A) No primeiro estágio ocorre a aderência da bactéria à mucosa do hospedeiro com participação das fímbrias AAF (linhas azuis), dispersina (pequenas esferas verdes) e proteína Pic (esfera rosa), uma proteína que degrada muco.

(B) No segundo estágio ocorre a elaboração de toxinas que agem principalmente no citoesqueleto da célula, como as toxinas Pet (esfera vermelha), EAST-1 (esfera cinza), ShET-1 (complexo A-B verde e vermelho) e enterohemolisina (esferas amarelas). (C) No terceiro estágio ocorre a indução da resposta inflamatória, mediada pela flagelina (linhas verdes), fímbrias AAF e outras estruturas não conhecidas.

Cinco variantes da fímbria AAF foram descritas até agora: AAF/I, II, III, IV e V; sendo todas elas reguladas pelo ativador transcricional AggR. Estas fímbrias são relacionadas às adesinas da família Dr, as quais requerem proteínas chaperonas e *usher* para sua biogênese. Além disto, as fímbrias da família Dr estão relacionadas também a cepas de UPEC, que comumente expressam adesinas Afa (CROXEN; FINLAY, 2010; JØNSSON et al., 2015; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

A mais nova variante, AAF/V, foi descoberta recentemente e revelou-se como uma variante quimérica de AAF/III, na qual todos os genes acessórios (*agg3CD*), bem como o gene da subunidade pilina (*agg3B*) são compartilhados, exceto pelo gene da subunidade unidade principal da pilina que é substituído por *agg5A* (JØNSSON et al*.,* 2015).

Outra característica de EAEC é a habilidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, resultado da agregação bacteriana (SHEIK et al., 2001). A formação de biofilme pode ser um importante fator contribuinte na infecção persistente, ao permitir que as bactérias evadam o sistema imunológico local e impedindo o transporte de fatores antibacterianos, incluindo antibióticos (PEREIRA, et al*.,* 2007; TOKUDA et al*.,* 2010). Em vários estudos, a expressão de AAF mostrou-se essencial para a formação de biofilme por EAEC (BOISEN, et al., 2008; BOLL et al*.,* 2013; FARFAN; INMAN; NATARO, 2008; SHAMIR et al*.*, 2010; SHEIK et al*.,* 2001).

Uma importante classe de toxinas produzidas por EAEC são as chamadas proteínas autotransportadoras. As proteínas autotransportadoras são proteínas de membrana externa que consistem de um amplo domínio N-terminal extracelular (domínio passageiro) e um domínio C-terminal que consiste em um domínio β-barril (domínio β). Este domínio foi originalmente proposto com a função de um canal de transporte para seu próprio domínio passageiro pela membrana externa (BERNSTEIN, 2007; HENDERSON et al., 2004). Inicialmente duas proteínas autotransportadoras foram identificadas em EAEC, Pet e Pic (ESLAVA et al., 1998;

HENDERSON et al., 1999), as quais fazem parte do grupo das SPATE, ou *serine protease autotransporters of* Enterobacteriaceae (DAUTIN, 2010). As SPATE compreendem serino proteases com funções diversas, tais como proteases, toxinas e adesinas (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

A família das SPATEs inclui mais de 25 proteínas e são divididas filogeneticamente em duas classes, com base na sequência de aminoácidos do domínio passageiro. A classe-1 alberga as proteínas com efeito citotóxico (AL-HASANI et al., 2000; AL-HASANI et al., 2009; DJAFARI et al., 1997; ESLAVA et al., 1998; HENDERSON et al., 1999; MARONCLE et al., 2006; MELLIES et al., 2001; TADDEI et al., 2005), enquanto a classe-2 inclui as proteínas imunomoduladoras, que além de modularem o sistema imune, desempenham funções como a degradação de mucina, moléculas do sistema complemento e de glicoproteínas de superfície de leucócitos (ABREU et al., 2015; ; DUTTA et al., 2002; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ; ARCINIEGA; NAVARRO-GARCIA, 2008; HARRINGTON et al., 2009; LEYTON et al., 2003; PARHAM, et al., 2004; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Dentre as proteínas de classe-1 que são frequentemente encontradas em cepas de EAEC estão as proteínas Sat (GUYER et al., 2000), Pet (ESLAVA et al., 1998) e SigA (AL-HASANI et al, 2000). As de classe-2 frequentemente encontradas em EAEC são Pic (HENDERSON et al., 1999) e SepA (BENJELLOUN-TOUIMI et al., 1998; BOISEN et al., 2012).

As principais infecções extraintestinais causadas por *E. coli* são as infecções do trato urinário (ITU), as sepses (frequentemente associadas à infecção urinária) e as meningites de recém-nascidos. As cepas causadoras destas doenças são coletivamente denominadas ExPEC (JOHNSON; RUSSO, 2005; PITOUT, 2012; RILEY, 2014).

Embora existam muitos estudos nessa área específica, o mecanismo de disseminação clonal de cepas ExPEC não está totalmente esclarecido (RILEY, 2014). Os fatores de virulência conhecidos em ExPEC são associados principalmente à colonização e capacidade de sobreviver no ambiente. Os genes que codificam esses fatores de virulência são localizados no cromossomo bacteriano, onde usualmente encontram-se em ilhas de patogenicidade, ou em plasmídeos e são separados em cinco grupos principais: adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro, produção

de cápsula e invasinas (DALE; WOODFORD, 2015). Os principais fatores de virulência encontrados neste grupo bacteriano são mostrados na Figura 3.

Uma das adesinas mais estudadas tanto em DEC como em UPEC é a fímbria tipo 1. Estudos tem demonstrado que essa adesina é um fator de virulência indispensável em UPEC, embora a ampla distribuição desse pili não esteja restrita somente a cepas patogênicas (NORINDER et al., 2012; VEJBORG et al, 2011).

A fímbria tipo 1 é necessária para colonizar o trato urinário em camundongos e humanos (BAHRANI-MOUGEOT et al., 2002; CONNELL et al.,1996), mas por si só não é suficiente para estabelecer uma infecção a longo prazo (MULVEY; SCHILLING; HULTGREN, 2001). A extremidade adesiva desta fímbria, FimH, liga-se a proteínas α-D-manosiladas, tais como as uroplaquinas (UPs), que são expressas pelo uroepitélio e, portanto, essa adesina está mais relacionada ao trato urinário baixo. Devido à sua afinidade de ligação, a adesão ou agregação mediada por FimH de células eucarióticas (leveduras ou glóbulos vermelhos) é inibida pela manose (LÜTHJE; BRAUNER, 2014).

As ITU apresentam alta morbidade, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, resultando em altos custos econômicos e diminuição da produtividade de trabalho (BRUMBAUGH; MOBLEY, 2012). A grande maioria das ITU (70 a 90%) é causada por *E. coli* uropatogênica (UPEC), a qual reside no trato intestinal em conjunto com as cepas de *E. coli* comensais e patogênicas e ascende à bexiga através da uretra, sendo que por esta via estas cepas também são capazes de causar sepse.

As ITU são mais comuns em mulheres do que em homens por características anatômicas do trato geniturinário feminino e da presença de substâncias antibacterianas no fluido prostático masculino (FIHN, 2003). Não obstante, a maior ocorrência em mulheres se dá por conta da maior proximidade do canal uretral com o ânus e pelo canal da uretra ser menor em relação ao canal uretral masculino (WANG et al., 2013).

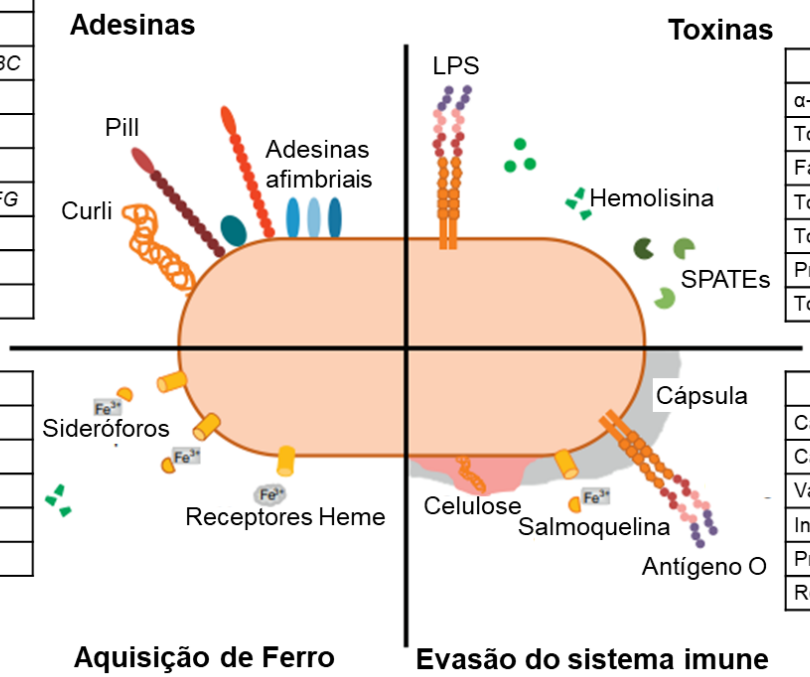
Figura 3- Principais fatores de virulência de ExPEC

Adesinas	Gene (s)
Sideróforo de adesão	*iha*
Adesina da família Dr	*afaA/draBC*
Pilus comum de *E. coli*	*ecpA*
Fímbria F1C	*foc*
Fímbria M	*bmaE*
Fímbria P	*papACEFG*
Fímbria S	*sfa/sfaS*
Hemaglutinina termo sensível	*tsh*
Fímbria tipo 1	*fimH*

Toxinas	Gene (s)
α-hemolisina	*hlyA*
Toxina citoletal distensora	*cdtB*
Fator citotóxico necrosante	*cnf1*
Toxina de *E. coli* enteroagregativa	*astA*
Toxina autotransportadora secretada	*sat*
Proteína envolvida em colonização	*pic*
Toxina vacuolizante	*vat*

Aquisição de Ferro	Gene (s)
Receptor de aerobactina	*iutA*
Proteína periplasmática de ligação ao Ferro	*sitA*
Receptor Salmoquelina	*iroN*
Receptor sideróforo	*ireA*
Receptor yersiniabactina	*fyuA*

Evasão do sistema imune	Gene (s)
Cápsula do grupo 2	*kpsMTII*
Cápsula do grupo 3	*kpsMTIII*
Váriantes K1/K2/K5 do grupo de cápsula 2	K1,K2,K5
Invasão do endotélio cerebral	*ibaA*
Proteína de conjugação	*traT*
Resistência ao soro	*iss*

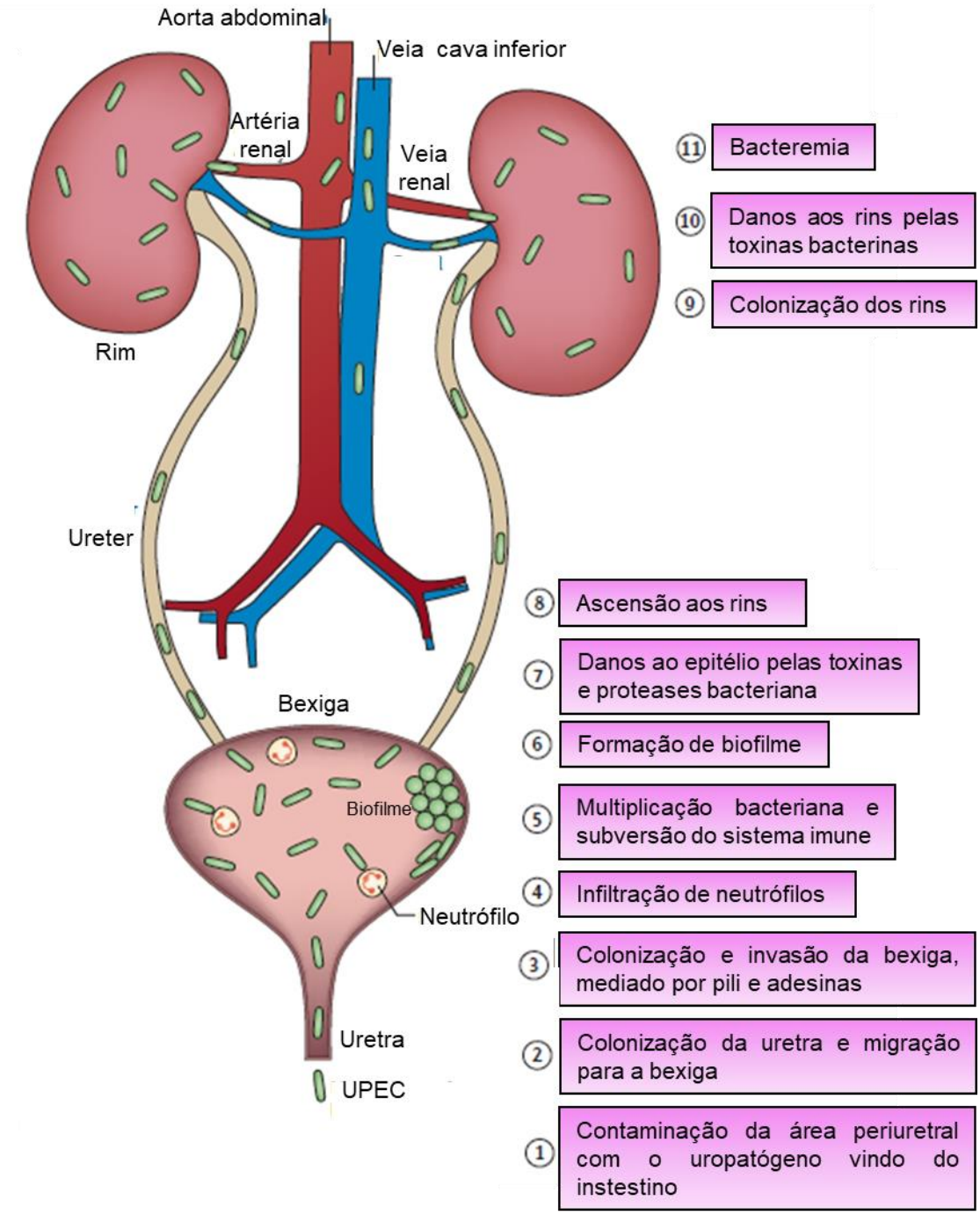


Adaptado de Dale e Woodford, (2015); Lüthje e Brauner, (2014).

As ITU podem ser classificadas em alta ou baixa. A ITU baixa começa com a colonização bacteriana na área periuretral pela contaminação fecal do trato gastrintestinal, seguida pela ascensão de bactérias através da uretra para a bexiga. Primeiramente ocorre adesão às células uroepiteliais por contas de adesinas, como por exemplo a fímbria tipo 1, seguida por apoptose e exfoliação das células epiteliais levando a um influxo de leucócitos polimorfonucleares, causando assim a cistite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A cistite não resolvida pode progredir para uma ITU alta, denominada pielonefrite, quando as bactérias sobem pelos ureteres e entram em um ou ambos os rins (MOBLEY; DONNENBERG; HAGAN, 2009). Neste estágio ocorre a vacuolização das células do epitélio renal e os danos aos glomérulos por conta da ação da toxina Sat. A pielonefrite, em alguns casos, evolui para bacteremia. Neste estágio o tratamento da doença é imprescindível, pois a partir da infecção renal as bactérias podem alcançar o sistema venoso e causar a sepse (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Assim, durante o curso de uma infecção, um uropatógeno bem-sucedido deve navegar em nichos dramaticamente diferentes, incluindo o trato gastrointestinal, a área periuretral, a uretra, a bexiga, o ureter, o rim e a corrente sanguínea (FORSYTH et al., 2018). As principais etapas da patogênese das infecções do trato urinário podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4- Esquema dos estágios da infecção do trato urinário por UPEC



Adaptado de Flores-Mireles et al. (2015).

As cepas de *E. coli* que são capazes de ocasionar sepse estão também relacionadas às meningites neonatais. Estas cepas são também conhecidas como NMEC e são fatais entre 15-40% dos casos ou causam danos neurológicos severos

na maioria dos sobreviventes (DAWSON; EMERSON; BURNS, 1999; UNHANAND et al., 1993).

1.3 EAEC como agente de infecções do trato urinário

Conforme mencionado anteriormente, EAEC é um patógeno entérico identificado em todo o mundo e associado à diarreia aguda e persistente em crianças e adultos, caracterizada pela produção do padrão AA quando em contato com a mucosa intestinal ou células epiteliais cultivadas (HEBBELTRUP JENSEN et al. 2014; NATARO et al. 1987). Nos últimos anos, EAEC tem sido também associada a casos de ITU.

O grupo da Profa. Tânia A. T. Gomes (Disciplina de Microbiologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP), iniciou na década de 1990 um estudo sobre a caracterização de cepas de UPEC isoladas de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos, buscando características fenotípicas e genotípicas de EAEC (FALSETTI, 1998). Esse estudo foi posteriormente ampliado para a pesquisa de marcadores de virulência dos outros patótipos de DEC, tais como EPEC, DAEC e EHEC. Foi possível evidenciar nessa coleção de 225 UPEC a presença de alguns marcadores de DEC, com destaque a um grupo com características de EAEC, ou seja, reatividade com a sonda para o gene *aatA* e/ou a produção do padrão AA em células HeLa (ABE et al., 2008; FALSETTI, 1998). Esses achados indicaram que algumas cepas de EAEC poderiam ter potencial uropatogênico.

Posteriormente um importante relato de Olesen et al. (2012) descreveu um clone multirresistente de *E. coli* (O78:H10) classificada como EAEC, responsável por de um surto de ITU de origem comunitária em Copenhague (Dinamarca), demonstrando pela primeira vez a associação entre EAEC e um surto de doença extraintestinal. Outros estudos também têm demostrado a presença de genes de virulência de DEC/EAEC em cepas causadoras de ITU (HERZOG et al., 2014; KHAIRY et al., 2019; LARA et al., 2017; NAZEMI et al., 2011); bem como características uropatogênicas entre EAEC isoladas de fezes (REGUA-MANGIA et al., 2010; WALLACE-GADSDENF et al., 2007).

Em continuidade ao estudo de Olesen et al. (2012), esse mesmo grupo buscou determinar as propriedades uropatogênicas das cepas do surto de Copenhague e se essas propriedades eram conferidas por fatores de virulência específicos de EAEC (BOLL et al., 2013). Os autores demostraram que através da expressão de fímbrias de adesão agregativa I (AAF/I), as cepas do surto demonstraram pronunciadamente o aumento da aderência às células epiteliais da bexiga humana, quando comparadas aos protótipos de cepas uropatogênicas. Além do mais, as cepas foram virulentas em um modelo murino de ITU e as mesmas foram capazes de produzir biofilmes distintos em superfícies abióticas, incluindo cateteres urinários. Esses achados sugeriram que tais fatores de virulência específicos de EAEC aumentam a uropatogenicidade e podem ter desempenhado um papel significante na capacidade de as cepas causarem o surto adquirido pela comunidade dinamarquesa.

Recentemente o nosso grupo realizou um estudo pesquisando a presença de marcadores genéticos de ExPEC em cepas de EAEC isoladas de fezes, tanto de casos de diarreia como de controles assintomáticos (NUNES et al., 2017). O objetivo deste estudo foi analisar as relações filogenéticas entre cepas de EAEC que apresentavam marcadores genéticos de ExPEC e cepas de UPEC com e sem marcadores genéticos de EAEC. Noventa e duas cepas de EAEC foram analisadas quanto à presença dos genes considerados como marcadores de ExPEC, conforme proposto por Johnson et al. (2003), ou seja, *papA* e/ou *papC*, *sfa*/*foc*, *afa*/*dra*, *iutA* e *kpsMT* II. Através deste critério, uma cepa de *E. coli* é classificada como ExPEC se apresentar pelo menos dois desses genes em quaisquer combinações, sendo que *papA* e *papC* quando em conjunto são considerados como um único marcador. Nessa classificação, dentre as 92 EAEC estudadas foram detectadas 33 cepas com esse perfil de ExPEC. Estas 33 cepas foram selecionadas para análises de filogrupos e *multilocus sequence type* (MLST) junto a 18 cepas de UPEC vindas do estudo de Abe et al. (2008). Foi então gerado um filograma com os dados das sequências dos genes *housekeeping* do MLST (Figura 5).

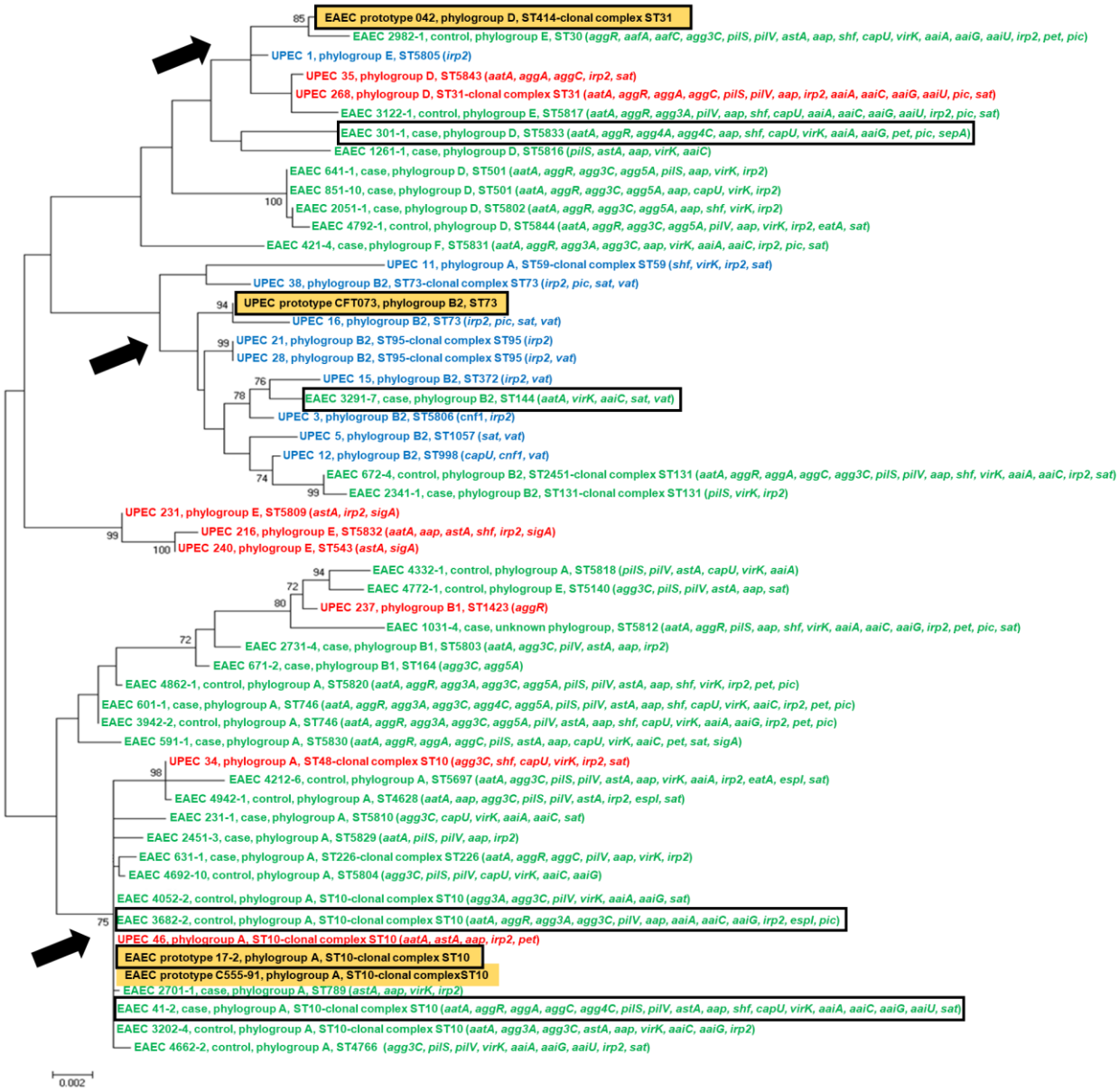
A árvore filogenética mostrou o grupamento das cepas de EAEC com marcadores de ExPEC (EAEC/ExPEC+) em três grupos principais: um primeiro relacionado à cepa diarreiogênica protótipo de EAEC (cepa 042); um segundo relacionado ao protótipo de UPEC (cepa CFT073); e um terceiro relacionado à cepa

de EAEC uropatogênica 078:H10 (clone que causou o surto de ITU na Dinamarca) juntamente à cepa 17-2 protótipo de EAEC isolada de diarreia, mas que apresenta marcas genéticas de UPEC.

É interessante notar que o terceiro grupo foi constituído por cepas fecais isoladas de casos de diarreia e controles saudáveis, todos do filogrupo A e a maioria pertencente ao *sequence type* (ST) 10; juntamente às cepas de EAEC 17-2 e C555-91 (sorotipo O78:H10). Vale ressaltar que a cepa C555-91 também foi isolada das fezes de um paciente com diarreia (BOLL et al., 2013). Além disso, a cepa EAEC 17-2, isolada de uma criança com diarreia aguda no Chile (NATARO et al., 1987) e protótipo da fímbria AAF/I, produz α-hemolisina e provoca destacamento celular de células HeLa em cultura, características de UPEC (GOMES et al., 1995).

Esses dados sugerem que cepas de EAEC podem apresentar potencial uropatogênico, tanto no curso de uma infecção diarreica, quanto em carreadores assintomáticos.

Figura 5- Filograma e características genéticas de cepas EAEC com marcadores de ExPEC e UPEC com e sem marcadores de EAEC



Adaptado de Nunes et al. (2017).

Filograma construído através do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. Em preto e destacado são as cepas protótipo, em verde são cepas EAEC classificadas como ExPEC, em azul são cepas UPEC sem a presença de marcadores de EAEC e em vermelho são cepas UPEC com marcadores de EAEC. As setas pretas evidenciam os três principais grupamentos: o *cluster* relacionado à EAEC 042; o *cluster* relacionado à UPEC CFT073; e o *cluster* relacionado às EAEC 078:H10 e 17-2. As cepas selecionadas para o experimento de ITU em modelo murino estão destacadas pelas barras pretas. Os dados referentes à presença de *agg5A* (pilina da fímbria AAF/V) e *cnf1* foram obtidos no presente estudo.

Tendo por base as características descritas anteriormente acerca de EAEC causadora de ITU, aliado aos dados relatando um subgrupo de EAEC colonizando o intestino e carreando marcadores genéticos de ExPEC, o presente estudo teve foco nas propriedades uropatogênicas de cepas EAEC isoladas de fezes de crianças com diarreia e de controles assintomáticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial uropatogênico de cepas EAEC isoladas de fezes.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Nas cepas classificadas como EAEC/ExPEC+: (a) definir a capacidade de adesão às células epiteliais cultivadas de linhagens humanas de bexiga e rins; (b) analisar a capacidade de formação de biofilme *in vitro;* (c) verificar a produção de fímbria tipo 1 e hemolisinas; (d) determinar a capacidade de causar ITU em um modelo murino de infecção ascendente.
- ✓ Comparar todas análises *in vitro* e *in vivo* obtidas com as cepas EAEC/ExPEC+ a um grupo de cepas classificadas como EAEC/ExPEC- e UPEC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Para este estudo foram selecionadas 44 cepas de EAEC isoladas de pacientes com diarreia aguda ou de controles assintomáticos, durante um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância, realizado na cidade de São Paulo, Brasil, incluindo crianças até 5 anos de idade (GOMES et al., 1998). Essas cepas foram previamente classificadas como EAEC através da detecção do padrão AA em células HeLa e caracterizadas quanto à prevalência de alguns genes de virulência de EAEC (ELIAS et al., 2002; GOMES et al., 1998). Posteriormente, no estudo de Nunes et al. (2017) essas 44 cepas foram classificadas ou não como ExPEC, considerando a presença dos marcadores genéticos *afa*/*dra*, *papA*, *papC*, *sfa*/*foc*, *iutA* e *kpsMT*II (JOHNSON et al., 2003). Desse total, 33 apresentavam os marcadores de ExPEC (EAEC/ExPEC+) e 11 não apresentavam esses marcadores (EAEC/ExPEC-).

Foram também selecionadas 18 cepas de UPEC para análises comparativas. Essas cepas foram isoladas de pacientes de ambos os sexos e diferentes idades, apresentando infecção do trato urinário sintomáticas, atendidos no Hospital São Paulo (Escola Paulista de Medicina, UNIFESP), na cidade de São Paulo, Brasil (FALSETTI, 1998). Dentre esse total, oito cepas apresentavam marcadores de virulência de EAEC, ou seja, o padrão AA de adesão em células HeLa e/ou reatividade com a sonda de diagnóstico de EAEC (gene *aatA*), enquanto dez cepas não apresentavam nenhum dos marcadores moleculares de EAEC (ABE et al., 2008; FALSETTI, 1998).

Todas as cepas foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB) (Kasvi) ou MacConkey (MC) (Kasvi) a 37 °C por 16-18 horas. Todas as cepas foram estocadas a partir do cultivo em caldo LB contendo glicerol a 15% (Labsynth) e mantidas em freezer -80 °C.

3.2 Reação em cadeia da polimerase (técnica de PCR)

Para cada reação de PCR foram utilizados: 40 pM de cada um dos iniciadores (*foward* e *reverse*), 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), 2 mM de MgCl2, 2,5 µl do tampão de reação de PCR 10X (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen), 2 µl do lisado bacteriano das cepas e água milliQ estéril para um volume final de 25 µl. Os lisados bacterianos, usados como DNA molde para as reações, foram obtidos a partir de uma colônia isolada em placa de ágar LB, a qual foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 300 µl de água MilliQ estéril. Esta mistura foi então ressuspendida e submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo. As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Waltham, MA, EUA). Após a amplificação, os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose.

3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TBE 0,5x (40 mM tris-borato; EDTA 1 mM) na concentração final de 0,8%, 1% ou 1,5%, dependendo do tamanho esperado dos fragmentos de DNA, e então corados com solução Unisafe Dye (20.000x) (UNISCIENCE) na concentração final de 1x.

Os produtos amplificados das PCRs foram acrescidos de tampão de corrida 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente elétrica de 70 V/cm em tampão TBE 1x, os géis foram observados em transiluminador de luz ultravioleta UVP (Upland, San Leandro, CA, EUA) e fotografados com o auxílio de sistema de imagem Alliance HD 6 (Uvitec, Reino Unido).

3.4 Pesquisa dos genes *agg5A* e *cnf1*

No sentido de complementar os dados de perfil genotípico previamente determinado por Nunes et al. (2017) nas cepas do presente estudo, foram pesquisadas as presenças dos genes *agg5A* e *cnf1*. O gene *agg5A* codifica a pilina da fímbria agregativa AAF/V (JØNSSON et al*.,* 2017), enquanto o gene *cnf1* codifica o fator necrosante citotóxico tipo 1, responsável por alterações celulares como multinucleação e aumento das células eucarióticas ocasionadas principalmente por cepas de UPEC (BLUM et al., 1995). A detecção desses genes foi realizada pela técnica de PCR, conforme descrito nos itens 3.2 e 3.3.

Para o gene *agg5A* foram utilizados os iniciadores *agg5A/forward* (5´-GTTTCATCAACTGGAACTATTACTATTT-3´) e *agg5A/reverse* (5´-TAATTTAAGCTGAAGAATCCAGTCAAT-3´), que amplificam um fragmento de 401 pb (JØNSSON et al*.,* 2017). A PCR para *agg5A* foi realizada utilizando o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 57 ºC e 1 min a 72 °C, seguido de extensão final por 7 min a 72 °C. A cepa EAEC BA120 (sorotipo O17:H18) (BUERIS et al*.*, 2007), foi utilizada como controle positivo após o sequenciamento de seu amplicon e confirmação da identidade com o gene *agg5A* depositado no GenBank (número de acesso KP202151). A cepa de *E. coli* DH5α foi usada como controle negativo.

Para o gene *cnf1* foram utilizados os iniciadores *cnf1/forward* (5´-ATGGGTAACCAATGGCAACAAA-3´) e *cnf1/reverse* (5´-AAATTTTTTTGAAAATACCTTC-3´), que amplificam um fragmento de 3.045 pb (número de acesso no GenBank: CP000243.1). A PCR para *cnf1* foi realizada utilizando o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 30 seg a 55 ºC e 4 min e 30 seg a 72 °C, seguido de extensão final por 10 min a 72 °C. A cepa protótipo de UPEC J96 (sorotipo O4:K6) (HULL et al., 1982), foi utilizada como controle positivo e a cepa de *E. coli* K-12 DH5α foi usada como controle negativo.

3.5 Cultivo das linhagens celulares

A linhagem de células epiteliais derivadas de câncer de bexiga humana 5637 (ATCC nº HTB-9) e as células embrionárias renais humanas HEK-293 (ATCC Nº CCL-1573) foram cultivadas *in vitro* para este estudo. As células HEK-293 foram rotineiramente mantidas em frascos de cultura de 25 cm^2 contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Cultilab) sem antibióticos, enquanto as células de bexiga 5637 foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) modificado (Cultilab), sob as mesmas condições. Ambas as linhagens foram mantidas durante 2 a 3 dias a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO^2, até que atingissem confluência de aproximadamente 80%.

Para a utilização nos ensaios, as células foram cultivadas em placas de cultura de células de 24 poços (Nunc) contendo lamínulas, a partir do cultivo nos frascos de 25 cm^2. Para o cultivo da linhagem celular HEK-293, as lamínulas foram previamente tratadas com solução de Poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich) em água destilada de acordo com o protocolo descrito por Sitterley (2008). As células tripsinizadas foram ressuspendidas nos respectivos meios (descritos acima) nas concentrações de $5x10^4$ células/mL para HEK-293 e $1,5x10^5$ células/mL para linhagem celular 5637 e 1 mL dessa suspensão foi colocado em cada poço. As preparações foram então incubadas durante 48 h em atmosfera com 5% de CO2.

3.6 Ensaio de adesão

O ensaio de adesão foi adaptado do método descrito por Cravioto et al. (1979), utilizando-se um período de incubação de 3 h. Após o cultivo das linhagens celulares nas microplacas por 48 h, o meio de cultivo de cada poço foi aspirado gentilmente e 960 µl dos respectivos meios, contendo agora 2% de SFB, foram colocados em cada poço. As células foram então infectadas com 40 µl das suspensões bacterianas cultivadas em caldo LB por 18 h de forma estática. Após o período de infecção de 3 h, as células foram lavadas com tampão PBS 0,01 M (cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico 4,3 mM; fosfato de potássio monobásico

1,5 mM) pH 7.4 por 3 vezes e fixadas com metanol 70% (Merck) por 30 min. Após a fixação, as células foram coradas por 5 min com solução corante eosina-azul de metileno em solução a 0,2% (May-Grünwald) (Merck) diluído na razão 1:2 em tampão de Sørensen (fosfato de potássio monobásico 8,6 mM; fosfato de sódio dibásico 28,6 mM). Em seguida esse corante foi desprezado, sendo então acrescentada a solução corante azur-eosina-azul de metileno (Giemsa) (Merck) diluída na razão 1:3 em tampão de Sørensen, por 20 min. Após lavagem, as lamínulas foram secas e montadas em lâminas com Entellan (Merck), sendo analisadas através de microscopia de luz sob aumento de 1.000 vezes. Estes ensaios foram realizados em duplicata.

3.7 Ensaio de produção de hemolisinas

O ensaio de produção de hemolisina foi adaptado do protocolo descrito por Beutin et al. (1989). Para este ensaio, placas de ágar-sangue foram preparadas com ágar base de tiptcaseína de soja (Becton Dickinson) 1,5%, suplementado com 10 mM de cloreto de cálcio e 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov). Para a lavagem das hemácias o sangue de carneiro desfibrinado foi centrifugado a 2.500 xg por 10 min e ressuspendido em tampão PBS 0,01 M pH 7.4 estéril no mesmo volume inicial de sangue. Este procedimento de lavagem foi realizado três vezes. Após as lavagens, as hemácias foram adicionadas ao ágar base estéril contendo cloreto de cálcio, resfriado a 50 ºC.

Para a detecção da atividade hemolítica as cepas bacterianas foram cultivadas previamente em 3 mL de caldo LB a 37 ºC sem agitação. A partir desse cultivo foram retirados 2 µL que foram aplicados sobre as placas de ágar sangue descritas acima. As semeaduras foram realizadas na forma de gotejamento com auxílio de micropipeta de forma perpendicular ao meio de cultura. As placas foram então examinadas após 3 e 24 h de incubação a 37 ºC para a análise da presença de zonas de hemólise ao redor do crescimento bacteriano. A presença de hemólise em até 3 h de incubação é indicativo da produção de α-hemolisina, enquanto a hemólise apenas após 24 h é indicativa da produção de enterohemolisina. Os ensaios foram realizados em duplicatas. As cepas UPEC J96 e *E. coli* K-12 DH5α, foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.8 Análise da presença de fímbria tipo 1

A presença de fímbria tipo 1 foi avaliada indiretamente através da capacidade das bactérias aglutinarem uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* em tampão PBS 0,01 M pH 7.4, conforme o protocolo descrito por Schembri et al. (2005). As cepas bacterianas foram cultivadas sem agitação em 3 mL de caldo LB a 37 °C por 18 h enquanto que as leveduras foram cultivadas em ágar extrato de levedura/peptona/dextrose (YPD, Difco), sob as mesmas condições. As cepas EAEC 17-2 e *E. coli* K-12 HB101, foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Um volume de 30 µL da suspensão bacterina e da levedura foram misturadas na superfície de uma lâmina de vidro e homogeneizado durante 2 min até o aparecimento de agregados visíveis a olho nu. As partículas aglutinadas indicam a presença de fímbria tipo 1 (resultado positivo).

Ensaios de inibição da aglutinação foram realizados com as cepas aglutinantes. Para isso o ensaio foi repetido na presença de 2% de D-manose. Essa etapa foi realizada nas mesmas condições do teste anterior, porém inicialmente a levedura foi misturada com 30 µL da solução de 2% de D-manose, sendo em seguida adicionada a suspensão bacteriana. Após homogeneização observou-se novamente a presença ou não de aglutinação.

3.9 Teste de capacidade de formação de biofilme

Os testes de formação de biofilme foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Sheikh et al. (2001). Cepas bacterianas cultivadas em caldo LB de forma estática durante 18 h a 37 °C foram diluídas (1:100) em meio DMEM contendo 4 % de glicose (DMEM alta glicose) (Cultilab) e distribuídas a um volume final de 200 µL em placas de poliestireno de 96 poços (Corning). Após incubação durante 18 h a 37 ºC, o meio de cultura foi desprezado e cada poço da microplaca foi lavado três vezes com tampão PBS 0,01 M pH 7.4. Em seguida, as células sésseis foram fixadas com 200 µL de etanol a 75% em cada poço, durante 10 min. Em seguida o etanol foi desprezado e o foi biofilme corado com uma solução 0,5% de cristal violeta (Laborclin) em etanol absoluto. Para isso, 200 µL do corante foram colocados em cada poço da

microplaca seguido de incubação por 5 min. As placas foram então lavadas quatro vezes com PBS 0,01 M pH 7.4 e secas à temperatura ambiente. A formação de biofilme foi quantificada dissolvendo-se o cristal violeta retido pelos biofilmes em 200 µl de etanol a 95% durante 2 min. Finalmente a densidade óptica foi medida em comprimento de onda de 595 nm (DO_{595}) com auxílio de um leitor de ELISA (Multiskan, Labsystems). As leituras de densidade óptica foram consideradas para as análises.

Todos os ensaios foram realizados na ausência e presença de metil-α-D-manopiranosídeo (α-D-man) a 1% (Sigma), o qual foi acrescentado ao DMEM alta glicose. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas. As cepas EAEC 042 e *E. coli* K-12 DH5α foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. A média e o desvio padrão do controle negativo foram utilizados como medida (*cutoff*) de formação de biofilme, conforme estabelecido por Stepanović et al. (2007).

3.10 Modelo de infecção ascendente do trato urinário

O modelo ascendente de infecção do trato urinário foi adaptado das metodologias descritas por Boll et al. (2013) e Hvidberg et al. (2000). Utilizou-se a linhagem C57BL/6 de camundongos *Mus musculus* fêmeas, com idade entre seis e 10 semanas e pesando 17 a 20 g. Utilizou-se grupos de oito animais para testar um conjunto representativo de cepas bacterianas deste estudo. As cepas selecionadas para o modelo murino estão descritas na Tabela 1. Toda a experimentação animal foi conduzida de acordo com a legislação brasileira atual de ética em pesquisa animal, seguindo os protocolos aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA Nº 88/2017) e do Instituto Butantan (Protocolo CEUAIB Nº8011010818).

Cada camundongo foi sedado com uma associação de 100 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina por via intraperitoneal. Após sedação, foi realizada a antissepsia da região perianal e genital com gaze estéril e álcool 70%. Em seguida, foi introduzido na uretra um cateter intravenoso ETFE (etileno-tetrafluoretileno) (Nipro Safelet), tamanho 24 G x ¾`` (Nipro), de forma a atingir a entrada da bexiga, cerca de ¾ do comprimento do cateter. Um volume de 50 µL de suspensão bacteriana contendo

aproximadamente $1x10^9$ UFC de cada cepa bacteriana foi injetado lentamente com auxílio de uma seringa de insulina de 1,0 mL (Descarpack) acoplada à extremidade do cateter.

As suspensões bacterianas foram preparadas conforme descrito a seguir. As cepas foram inicialmente cultivadas em 3 mL de caldo LB a 37 ºC por 18 h em condições estáticas. Em seguida, 100 µL dessa suspensão bacteriana foi semeada em ágar LB, incubadas a 37 ºC por 18 h. Após esse período, o crescimento bacteriano foi retirado com auxílio de uma alça estéril descartável e o inóculo bacteriano foi preparado ressuspendendo esse crescimento em 3,0 mL de solução salina 0,85%. O inóculo foi ajustado visualmente de acordo com a escala 7 de McFarland (2×10^9 UFC/mL). Um volume de 1,5 mL (3×10^9 UFC) dessa suspensão bacteriana foi transferido para um microtubo de 2,0 mL, centrifugado a 5.000 rpm por 5 min e o sedimento foi ressuspendido em 150 µL (3×10^9 UFC) de solução salina 0,85%. Esse volume foi necessário devido ao volume residual do canhão da seringa de insulina que retém 100 µL. Dessa forma, somente 50 µL ($1x\ 10^9$ UFC) do inóculo foram inoculados em cada animal. Após a inoculação, a seringa foi desacoplada do cateter, o qual foi mantido na uretra por alguns minutos para evitar o refluxo do inóculo. Após a retirada lenta do cateter os animais foram observados até a finalização da anestesia.

Após três dias os animais foram sacrificados com uma associação de xilazina (30 mg/kg) e cetamina (300 mg/kg) injetada por via intraperitoneal. Após a antissepsia com álcool 70%, foi realizada incisão para retirada dos rins e bexiga, os quais foram removidos assepticamente, pesados e colocados em tubos de centrífuga (Corning) contendo 1,0 mL de solução salina a 0,85%. Os órgãos foram mantidos em gelo até a homogeneização com auxílio do disruptor de tecidos Omi Myxer (OMNI-TH), com auxílio da sonda média funcionando no ciclo baixo durante 15 seg. Posteriormente, diluições seriadas (de 10^1 até 10^8) foram semeadas em placas de ágar MC para contagem de colônias. Em paralelo as suspensões de tecidos foram também semeadas em ágar LB para confirmação de que não haviam contaminantes de outras espécies. As placas de ágar MC e ágar LB foram incubadas a 37 ºC durante 18 h. A recuperação bacteriana foi calculada como o número de UFC por grama de órgão.

Para confirmação da identidade da cepa recuperada após a disrupção dos tecidos, colônias isoladas das placas de ágar MC foram coletadas de acordo com os órgãos analisados. Com essas colônias foram realizados lisados bacterianos (item

3.2) que foram usados em reações de PCR para genes de virulência específicos de cada cepa inoculada. A técnica foi realizada conforme descrito nos itens 3.2 e 3.3, utilizando-se os iniciadores e condições descritas na Tabela 2.

Tabela 1- Cepas selecionadas para os experimentos de ITU em camundongos C57BL/6

Cepa	Descrição	Marcadores de virulência de EAEC	Marcadores de virulência de ExPEC	Referência
17-2	EAEC protótipo da fímbria AAF/I, isolada de diarreia, sorotipo O3:H2, pertencente ao *cluster* O78:H10, filogrupo A, ST10, sorotipo O3:H2	*aatA, aggR, aggA, aggC, astA, aap, shf, capU, virk, aaiA, aaiC, aaiG, aaiU* (EAEC típica – AAF/I)	*iutA, kpsMT* II, *papA, papC*	NATARO et al., 1992
41-2	EAEC/ExPEC+ isolada de diarreia, pertencente ao *cluster* O78:H10, filogrupo A, ST10	*aatA, aggR, aggA, aggC, agg4C, aap, pilS, pilV, astA, shf, capU, virK, aaiA, aaiC, aaiG, aaiU, sat* (EAEC típica – AAF/I)	*iutA, kpsMT* II, *papA, papC*	NUNES et al., 2017
3682-2	EAEC/ExPEC+ isolada de controle assintomático, pertencente ao *cluster* O78:H10, filogrupo A, ST10, sorotipo O3:H2	*aatA, aggR, agg3A, agg3C, aap, pilV, aaiA, aaiC, aaiG, irp2, espI, pic* (EAEC típica – AAF/III)	*iutA, kpsMT* II, *papC*	NUNES et al., 2017
3291-7	EAEC/ExPEC+ isolada de diarreia, pertencente ao *cluster* UPEC CFT073, filogrupo B2, ST144	*aatA, virK, aaiC, sat, vat* (EAEC atípica – sem AAF)	*iutA, kpsMT* II, *papC*	NUNES et al., 2017
042	EAEC protótipo da fímbria AAF/II, isolada de diarreia, não classificada como ExPEC pelos critérios de Johnson et al. (2003), filogrupo D, ST414, sorotipo O44:H18	*aatA, aggR, aap, aaiC, aafA, aafC, shf, capU, virK, pet, pic* (EAEC típica- AAF/II)	*kpsMTII*	NATARO et al., 1987
301-1	EAEC/ExPEC+ isolada de diarreia, pertencente ao cluster EAEC 042, filogrupo D, ST5833	*aatA, aggR, agg4A, agg4C, aap, shf, capU, virK, aaiA, aaiG, pet, pic, sepA* (EAEC típica – AAF/IV)	*iutA, kpsMT*II	NUNES et al., 2017

3301-1	EAEC isolada de diarreia, não classificada como ExPEC pelos critérios de Johnson et al. (2003), filogrupo desconhecido, sorotipo O21:H2	*aatA, aggR, aaiA, aaiG, agg3A, agg3C, aap, shf, irp2, virK, espI, pic* (EAEC típica- AAF/III)	-	NUNES et al., 2017
3531-3	EAEC isolada de diarreia, não classificada como ExPEC pelos critérios de Johnson et al. (2003), filogrupo A	*aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, aggA, aggC, aap ,shf, irp2, virK, sat, pic, espI* (EAEC típica- AAF/I)	-	NUNES et al., 2017
3861-2	EAEC isolada de diarreia, não classificada como ExPEC pelos critérios de Johnson et al. (2003), filogrupo A, sorotipo O99:H17	*aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, aaiU, aap, agg4A, agg4C, agg3C, astA, shf, irp2, virK, capU, pic* (EAEC típica- AAF/IV)	-	NUNES et al., 2017
CFT073	UPEC protótipo de infecção urinária, filogrupo B2, ST73, sorotipo O6:H1	-	*papA, papC, sfa/foc, iutA, kpsMTII*	MOBLEY et al., 1990
MG1655	Cepa de *E. coli* K-12 comensal com poucas modificações genéticas, sorotipo OR:H48	-	-	JENSEN, 1993

Tabela 2- Sequências dos iniciadores, tamanhos dos amplicons e temperaturas de anelamento das PCR para confirmação da identidade das cepas recuperadas nos rins e bexigas nos experimentos de ITU em camundongos C57BL/6

Gene	Iniciadores	Função	Anelamento (ºC)	Amplicon (pb)	Referência
papA	(F) ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG (R) CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	Adesina da fímbria P	62	720	JOHNSON et al., 2003
papC	(F) GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA (R) ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	*Usher* da fímbria P	62	200	JOHNSON et al., 2003
kpsMTII	(F) GCGCATTTGCTGATACTGTTG (R) CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	Síntese de polissacarídeo capsular do grupo II (K1, K5 e K12)	62	272	JOHNSON et al., 2003
aggR	(F) CGATACATTAAGACGCCTAAAG (R) TCTGATACATTAAATTCATCTGC	Regulador global em EAEC envolvido na expressão de fatores de virulência	56	346	ANDRADE et al., 2014
ecpA	(F) ACCTCGGGAAGAAAAGCAAT (R) CAATTCGTCCAGGAATAAA	Pilus comum de *E. coli*	56	640	MUNHOZ, et al., 2018

(F), iniciador *forward*; (R), iniciador *reverse*; *papA*, gene pesquisado para as cepas CFT073 e 41-2; *papC*, gene pesquisado para a cepa 3291-7; *kpsMTII*, gene pesquisado para a cepa 301-1; *aggR*, gene pesquisado para as cepas 17-2, 042, 3301-1, 3531-3 e 3682-2; *ecpA*, gene pesquisado para a cepa MG1655.

3.11 Análise estatística

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para avaliação estatística e os valores de P<0,05 (*), P<0,01 (**), P<0,001 (***) e P<0,0001 (****) foram considerados estatisticamente significativos. Para as análises foi utilizado o *sofware* Prism Graph 6.0 (GraphPad ©, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa dos genes *agg5A* e *cnf1* entre cepas deste estudo

No sentido de complementar o perfil de fímbrias AAF das cepas deste estudo, determinado por Nunes et al. (2017), foi analisada a presença do gene *agg5A* (pilina da fímbria AAF/V) através da técnica de PCR. Observou-se no geral baixa frequência deste gene. Conforme apresentado na Figura 6, foi detectada a presença do gene *agg5A* em 8 (24,2%) das cepas EAEC/ExPEC+ e 2 (18,2%) das EAEC/ExPEC-, enquanto que este gene não foi detectado entre o grupo das UPEC. Esses resultados foram adicionados ao perfil genético das cepas dentro da árvore filogenética apresentada na Figura 5. O gene *agg5A* foi detectado em associação com os genes *aggR* e/ou *aag3C* (Tabela 3), indicando a presença do operon que codifica AAF/V nessas cepas. Houve também a detecção de três cepas EAEC/ExPEC+ com o perfil híbrido das fímbrias AAF/III e AAF/V, descrito por Jønsson et al. (2015).

O gene *cnf1* também foi pouco frequente, sendo detectado apenas em duas cepas de UPEC sem marcadores de EAEC (UPEC 3 e UPEC 12), apresentadas na Figura 5.

Figura 6- Prevalência do gene *agg5A* entre as cepas deste estudo

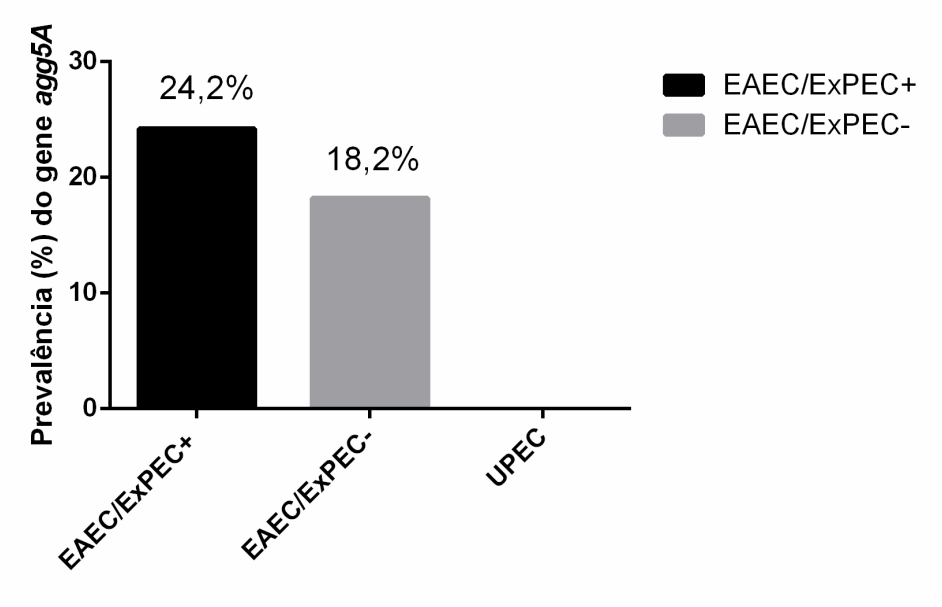


Tabela 3- Perfil genético relacionado à biogênese das fímbrias AAF apresentado pelas cepas positivas para *agg5A*

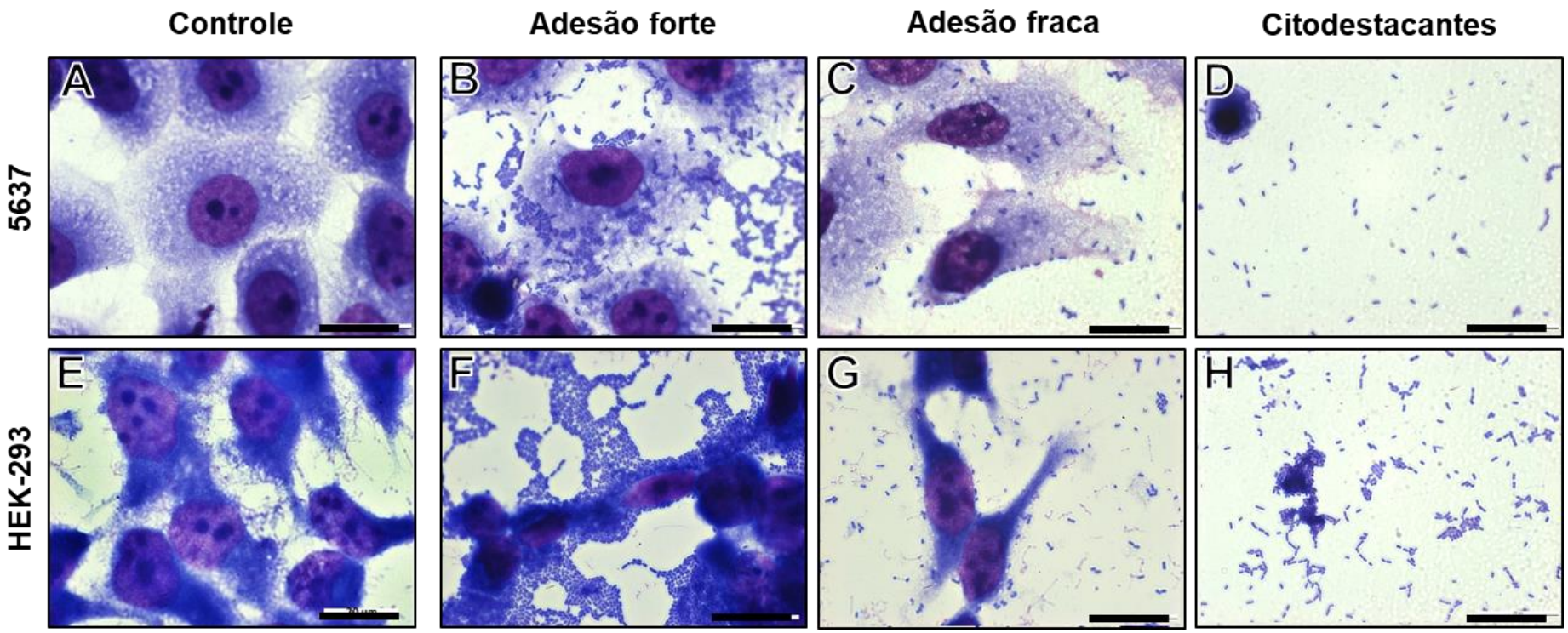
	Cepa	Perfil genético
ExPEC+	641-1	*aggR, agg3C, agg5A*
	851-10	*aggR, agg3C, agg5A*
	2051-1	*aggR, agg3C, agg5A*
	4792-1	*aggR, agg3C, agg5A*
	671-2	*agg3C, agg5A*
	601-1	*aggR, agg3A, agg3C, agg5A*
	3942-2	*aggR, agg3A, agg3C, agg5A*
	4862-1	*aggR, agg3A, agg3C, agg5A*
ExPEC-	3621-2	*aggR, agg3A, agg3C, agg5A*
	3642-2	*aggR, aggA, aggC, agg5A*

4.2 Adesão em células humanas de bexiga e rim cultivadas

Todas as cepas deste estudo foram avaliadas quanto à capacidade de aderir às células humanas de bexiga e rins, usando as linhagens celulares 5637 e HEK-293. A aderência bacteriana em ambas as linhagens celulares na ausência de manose foi observada em diferentes intensidades. A Figura 7 apresenta imagens representativas com algumas cepas deste estudo, apresentando adesão forte, fraca ou causando citodestacamento.

Os ensaios de adesão realizados com células da bexiga 5637 mostraram que 82% das cepas analisadas eram aderentes, 12% causaram destacamento celular e 6% não aderiram; enquanto os ensaios realizados com células renais HEK-293 mostraram que 88% eram aderentes e 12% causaram descolamento celular. Uma avaliação segmentada entre os grupos testados EAEC/ExPEC+, EAEC/ExPEC- e UPEC é apresentada na Tabela 4. Em todos os grupos, independentemente da linhagem celular, a prevalência de bactérias aderentes foi predominante, especialmente no grupo EAEC/ExPEC- onde 100% das cepas foram aderentes. Observou-se semelhança entre os perfis das linhagens EAEC/ExPEC+ e UPEC, onde o descolamento celular foi verificado em 12% e 27,8%, respectivamente.

Figura 7- Perfis de adesão observados no ensaio de adesão após 3 h de incubação com as linhagens celulares 5637 (bexiga) e HEK-293 (rins) na ausência de manose



Nota: Controles de células e algumas cepas EAEC testadas nos ensaios de adesão. A e E, controles de células 5637 e HEK-293, respectivamente; B, cepa EAEC 4052-2; C, cepa EAEC 4862-1; D, cepa EAEC 3291-7; F, cepa EAEC 3682-2; G, cepa EAEC 301-1; H, cepa EAEC 591-1. Barras= 20 µm.

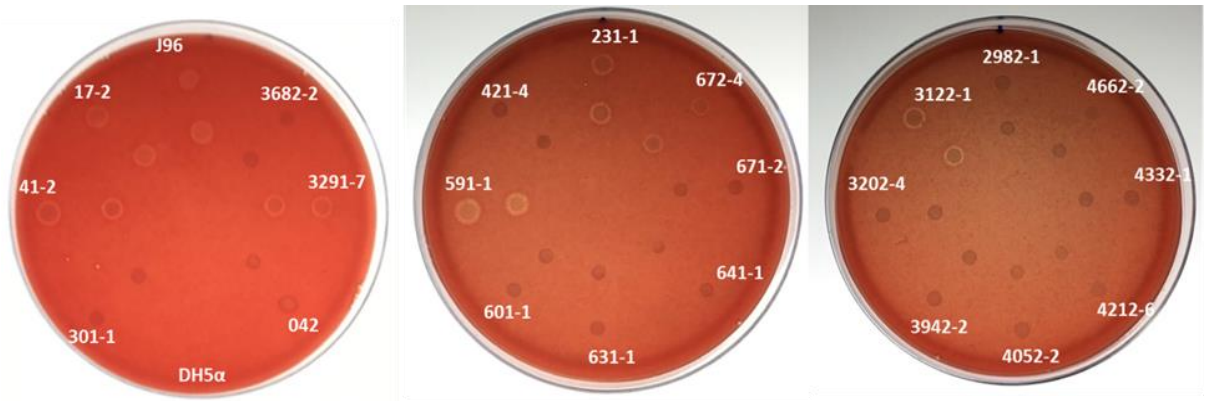
Tabela 4- Ensaios de adesão realizados com as linhagens celulares 5637 e HEK-293, após 3 h de incubação bactérias-células na ausência de manose

Cepas	N (%)	5637			HEK-293		
		Aderentes	Citodestacantes	Não aderentes	Aderentes	Citodestacantes	Não aderentes
EAEC/ExPEC+	33 (100)	27 (82)	4 (12)	2 (6)	29 (88)	4 (12)	-
EAEC/ExPEC-	11 (100)	11 (100)	-	-	11 (100)	-	-
UPEC	18 (100)	12 (66,7)	5 (27,8)	1 (5,5)	13 (72,2)	5 (27,8)	-

4.3 Produção de hemolisinas

Todo o conjunto de cepas foi analisado quanto à produção de hemolisinas em ágar sangue contendo cloreto de cálcio. Foi observado que 17,7% das cepas apresentaram atividade hemolítica após 3 h de incubação a 37 ºC, indicando a produção de α-hemolisina (Figura 8). Apenas a cepa EAEC/ExPEC- 3301-1 produziu hemolisina após o período de 24 h de incubação, indicando a produção de outras hemolisinas que não a α-hemolisina, tal como a enterohemolisina. Uma avaliação segmentada entre os grupos testados EAEC/ExPEC+, EAEC/ExPEC- e UPEC está apresentada na Tabela 5, onde pode-se observar uma maior produção de α-hemolisina entre as UPEC (27,8% das cepas) e as EAEC/ExPEC+ (18,2% das cepas), respectivamente.

Figura 8- Presença de α-hemolisina em algumas cepas após 3 h de incubação em ágar sangue de carneiro suplementado com cloreto de cálcio



Nota: Produção de α-hemolisina por algumas cepas do presente estudo. Cepas UPEC J96 e *E. coli* K-12 DH5α, controles positivo e negativo, respectivamente. Resultado positivo paras as cepas EAEC 17-2, EAEC 41-2, EAEC 231-1, EAEC 591-1, EAEC 672-4, EAEC 3122-1 e EAEC 3291-7.

Tabela 5- Prevalência de α-hemolisina entre os diferentes grupos de cepas

Cepas	Nº (%) de cepas		
	Presente	Ausente	Total
EAEC/ExPEC+	6 (18,2)	27 (81,8)	33 (100)
EAEC/ExPEC-	0 (0)	11 (100)	11 (100)
UPEC	5 (27,8)	13 (72,2)	18 (100)
Total	11 (17,7)	51 (82,3)	62 (100)

4.4 Detecção fenotípica da fímbria tipo 1 entre as cepas deste estudo

A expressão da fímbria tipo 1 foi avaliada indiretamente pela capacidade das cepas de aglutinar uma suspensão de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Ensaios de inibição da aglutinação também foram realizados na presença de 2% de D-manose para confirmar que a aglutinação ocorreu devido ao reconhecimento específico de resíduos manosídicos pela fímbria tipo 1.

Foi observado que 66,1% das cepas aglutinaram a suspensão de levedura, e que este fenótipo foi inibido pela presença de 2% de D-manose, confirmando-se que a aglutinação foi decorrente ao reconhecimento da fímbria tipo 1 pelos compostos manosídicos da parede fúngica (Tabela 6). Analisando-se os grupos separadamente, observou-se que a prevalência de fímbria tipo 1 nos grupos EAEC/ExPEC+ (72,7%) e EAEC/ExPEC- (63,3%) foi superior à observada entre as UPEC (55,5%).

Tabela 6- Presença da fímbria tipo 1 entre os diferentes grupos de cepas analisadas no ensaio de aglutinação de levedura

Cepas	Nº (%) de cepas		
	Presente	Ausente	Total
EAEC/ExPEC+	24 (72,7)	9 (27,3)	33 (100)
EAEC/ExPEC-	7 (63,6)	4 (36,4)	11 (100)
UPEC	10 (55,5)	8 (45,5)	18 (100)
Total	41 (66,1)	21 (33,9)	62 (100)

4.5 Capacidade de formação de biofilme

A capacidade de todas as cepas deste estudo em formar biofilme em superfícies de poliestireno foi analisada na presença e ausência de manose. Essa capacidade foi detectada em 61,3% das cepas quando o ensaio foi realizado sem α-D-man (Tabela 6). Analisando-se os resultados obtidos no ensaio com a presença de α-D-man, observamos que o número de cepas formadoras de biofilme diminuiu para 54,8%. Uma visão segmentada dos diferentes grupos de cepas deste estudo pode ser observada na Figura 7, onde as densidades ópticas determinadas para cada cepa são apresentadas.

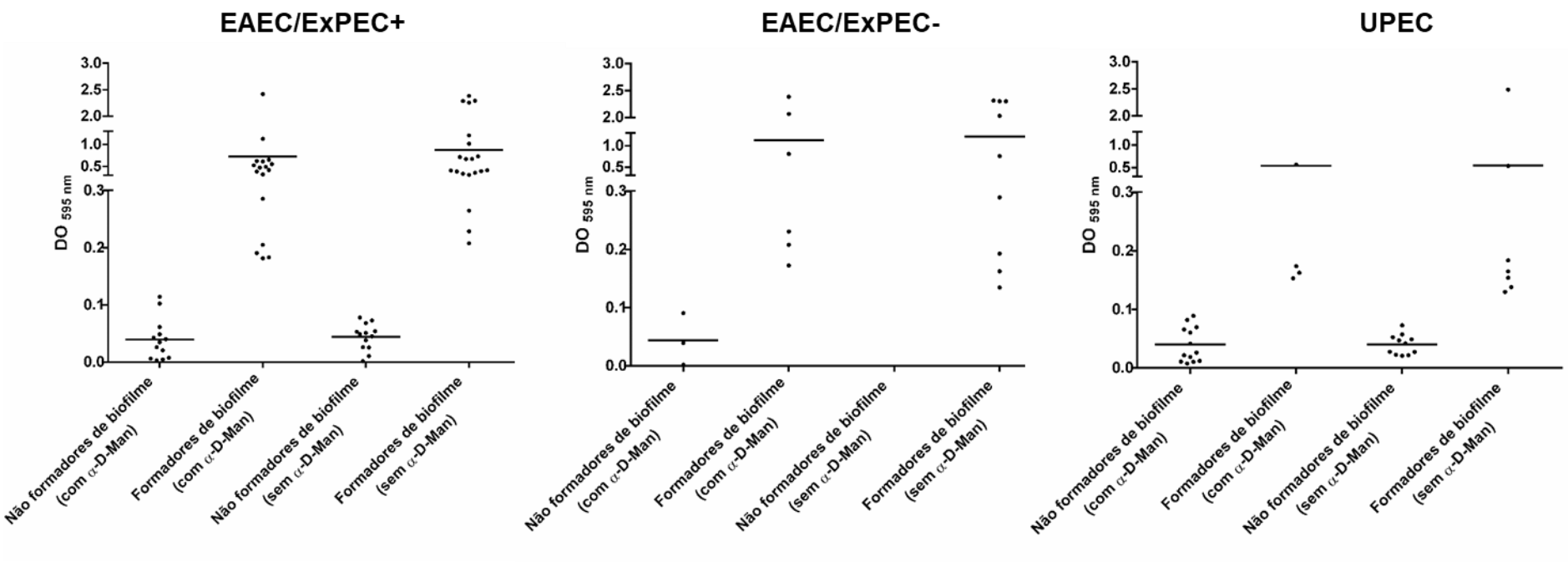
Analisando-se os grupos da Tabela 7, especialmente o das EAEC/ExPEC+, observou-se que a capacidade de formar biofilme foi detectada em 60,6% das cepas e que este fenótipo não foi inibido pelo α-D-man, sugerindo que outras adesinas além da fímbria tipo 1 podem estar envolvidas na formação de biofilme por essas linhagens. Em relação às cepas pertencentes ao grupo EAEC/ExPEC-, observou-se uma alta capacidade de formar biofilme tanto na presença quanto na ausência de α-D-man. Para o grupo UPEC, em geral, observou-se que a formação de biofilme foi menor que os demais grupos em ambas condições testadas.

Tabela 7- Capacidade de formação de biofilme em poliestireno após cultivo em DMEM alta glicose por 24 h a 37 °C [a]

Cepas	Nº (%) de cepas				
	Total	Presença de 1% α-D-Man		Ausência de 1% α-D-Man	
		Formadores de biofilme	Não formadores de biofilme	Formadores de biofilme	Não formadores de biofilme
EAEC/ExPEC+	33 (100)	20 (60,6)	13 (39,4)	20 (60,6)	13 (39,4)
EAEC/ExPEC-	11 (100)	8 (72,7)	3 (27,3)	11 (100)	-
UPEC	18 (100)	5 (27,8)	13 (72,2)	7 (38,9)	11 (61,1)

[a] As cepas foram classificadas como formadoras e não formadoras de biofilme segundo o estudo proposto por Stepanović *et al*.(2007), onde o ponto de corte (DOc) foi definido como valor da média mais três vezes o desvio padrão do valor da densidade óptica da cepa controle negativo (*E. coli* DH5α).

Figura 9- Leituras das densidades ópticas nos testes de formação de biofilme em poliestireno, após cultivo em DMEM alta glicose por 24 h a 37 °C [a]



[a] Os resultados são apresentados como médias das triplicatas obtidas de três experimentos independentes. As cepas foram classificadas como formadoras e não formadoras de biofilme segundo o estudo proposto por Stepanović *et al*.(2007), onde o ponto de corte (DOc) foi definido como valor da média mais três vezes o desvio padrão do valor da densidade optica da cepa controle negativo (*E. coli* DH5α).

4.6 Colonização da bexiga e rins no modelo murino de ITU

Para investigar a capacidade das cepas de causar ITU e avaliar a influência dos fatores de virulência de ExPEC em EAEC, um modelo murino de ITU ascendente foi realizado. Grupos de oito camundongos C57BL/6 foram inoculados transuretralmente com $1x10^9$ UFC de cinco EAEC/ExPEC+ e quatro EAEC/ExPEC-, descritas na Tabela 2. Para fins de padronização do modelo animal e para a obtenção de valores quantitativos para análises comparativas, também foram avaliadas as cepas UPEC CFT073 (protótipo de UPEC e controle positivo de ITU em modelo murino) e a *E. coli* MG1655 (K-12 de origem comensal sem fatores de virulência). Após o período de infecção de 72 h os animais foram eutanasiados, bexigas e rins retirados e a presença quantitativa das bactérias foi determinada nesses órgãos.

Conforme esperado para a cepa protótipo de UPEC CFT073 (controle positivo), a mesma foi capaz de colonizar bexiga e rins, apresentando índices médios de infecção próximos a 10^6 UFC/g na bexiga e 10^2 UFC/g nos rins (Figura 10). A cepa de *E. coli* K-12 de origem comensal, a qual é usada como controle negativo nesse tipo de modelo de ITU, causou baixa colonização da bexiga (média aproximada de 10^2 UFC/g) e não infectou os rins. Esses índices de UFC/g obtidos com a cepa MG1655 foram usados para as análises estatísticas com as outras cepas.

Todas as cepas EAEC/ExPEC+ foram capazes de causar ITU nesse modelo, embora nem todas as cepas tenham apresentado uma infecção estatisticamente significativa. Verificou-se que para as cepas EAEC/ExPEC+, todas as amostras de bexiga estavam infectadas, com uma contagem bacteriana média de aproximadamente $1x10^4$ UFC/g de bexiga (Figura 10). No entanto, as contagens bacterianas da EAEC/ExPEC- 3531-3 nas bexigas foram semelhantes às das cepas EAEC/ExPEC+ (Figura 9).

Uma infecção menos pronunciada foi observada nos rins, onde 4 das 5 cepas de EAEC/ExPEC+ foram capazes de infectar, embora apenas duas cepas (17-2 e 3291-7) alcançaram níveis de UFC/g com diferenças estatisticamente significativas. É importante salientar que nenhuma cepa EAEC/ExPEC- foi capaz de causar infecção nos rins (Figura 10). Outro achado importante refere-se à cepa protótipo de EAEC 17-

2, a qual apresentou as taxas de infecção mais significativas, tanto na bexiga como nos rins, com picos de infecção próximos a 10^8 e 10^{10} UFC/g, respectivamente.

Algumas informações importantes a respeito do perfil genético e fenotípico das cepas analisadas no modelo murino de ITU são apresentadas no quadro da Figura 10. A análise comparativa dos resultados de cada característica foi realizada no intuito de verificar a possível associação entre um marcador genético ou fenotípico e a capacidade de causar cistite e/ou pielonefrite.

Com relação às características filogenéticas, nota-se que a maioria das cepas pertence ao filogrupo A. Entretanto, não houve associação entre a classificação nesse filogrupo e o potencial uropatogênico, visto que a cepa 3861-2 desse filogrupo não causou ITU. O ST10 foi o mais frequente nas cepas que causaram ITU; entretanto, cabe salientar que os STs das cepas EAEC/ExPEC- não foram determinados neste estudo, limitando essa análise comparativa.

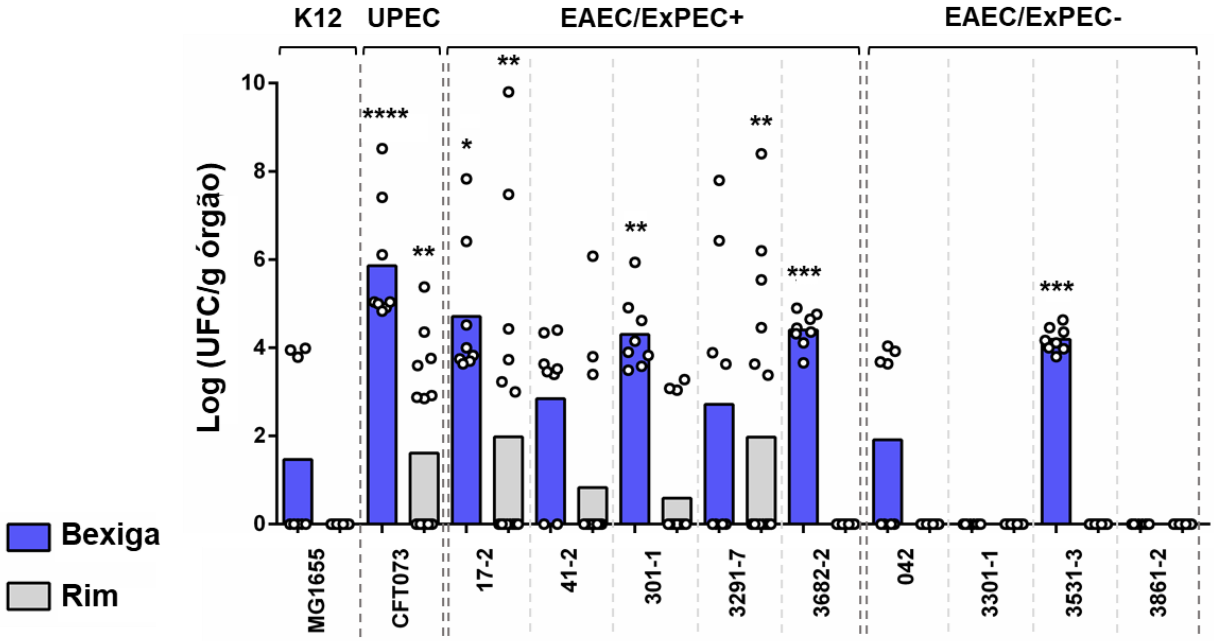
Ao analisar os marcadores de EAEC, pode-se observar que o potencial uropatogênico não foi associado à classificação da cepa como EAEC típica (*aggR*+) ou EAEC atípica (*aggR*-), visto que a cepa 3291-7 (*aggR*-/*aatA*+) foi capaz de colonizar bexiga e rins. O mesmo ocorreu com relação ao tipo de fímbria AAF presente na cepa. Cepas representativas dos cinco tipos AAF foram avaliadas e não houve associação entre o tipo de fímbria e a infecção nos órgãos avaliados. Cabe salientar que a cepa 3291-7, desprovida de AAFs, foi capaz de causar infecção nos rins e bexiga, com associação estatística nas análises dos rins. Ao considerar os potenciais marcadores genotípicos e fenotípicos associados a UPEC (fímbrias P, S e tipo 1, produção de hemolisina, *cnf1*, *pic*, *sat* e *vat*), nota-se que também não houve associação entre essas características e a uropatogenicidade.

Da mesma foram, as características de adesão em células de bexiga e rins, bem como a capacidade de formar biofilme, foram indistintas entre as cepas que causaram ou não ITU. Embora duas cepas (17-2 e 3291-7) tenham causado citodestacamento em ambas as linhagens celulares, essa característica também não foi associada à uropatogênese considerando que cepas não citodestacantes também causaram ITU.

Em resumo, os resultados aqui obtidos com o modelo murino de ITU mostraram que as cepas que de acordo com o critério de Johnson et al. (2003) são classificadas

como ExPEC (EAEC/ExPEC+) foram capazes de estabelecer a ITU de forma mais eficiente, uma vez que infectaram tanto a bexiga quanto os rins.

Figura 10- Contagens de UFC/g de tecidos (bexigas e rins) após inoculação intravesical de cepas de EAEC/ExPEC+ e EAEC/ExPEC- em camundongos C57BL/6



	MG1655	CFT073	17-2	41-2	301-1	3291-7	3682-2	042	3301-1	3531-3	3861-2
Critérios de Johson	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Filogrupo	A	B2	A	A	D	B2	A	D	ND	A	A
Sequence type (ST)	10	73	10	10	5833	144	10	414	NT	NT	NT
Aderência à HeLa	NT	NT	CD	CD	AA	CD	AA	AA	AA	AA	AA
Aderência à 5637	NT	NT	CD	+	+	CD	+	+	+	+	+
Aderência à HEK-293	NT	NT	CD	+	+	CD	+	+	+	+	+
Biofilme	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-hemolisina	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Fímbria tipo 1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
AAF	-	-	I	I	IV	-	III	II	III	I	IV
aggR	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
aatA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ilha de patogenicidade *aai*	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pic	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
sat	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
vat	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
cnf1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
***hlyA* (α-hemolisina)**	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Fímbria P	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Fímbria S	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: grupos de oito camundongos C57BL/6 foram transuretralmente inoculado com 10^9 UFC/g e eutanasiados após 72 h de infecção de acordo com cada cepa analisada. (A) e (B), respectivamente, mostram a recuperação bacteriana de bexigas e rins após esse período. Os dados são apresentados como as médias de UFC/peso de órgão (g), e a análise estatística foi realizada usando o teste de Mann-

Whitney comparando-se a cepa de *E. coli* MG1655 (controle negativo) contra as outras cepas. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 e **** P <0,0001. Um breve resumo dos principais marcadores de virulência de EAEC e ExPEC presentes em cada cepa testada (NUNES et al., 2017 e este estudo), bem como outras características importantes também são mostrados. Neste resumo, os resultados são apresentados como (+) = presente e (-) = ausente; Critérios de Johnson (Johnson et al., 2003); AAF I a V = Cinco tipos de fímbrias de adesão agregativa de EAEC; (AA)= adesão agregativa (CD)= citodestacante; (ND)= não definido; (NT)= não testado.

DISCUSSÃO

Os patótipos de *E. coli* foram descritos com base na presença de genótipos e/ou fenótipos característicos associados à patogenicidade (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016; KAPER et al., 2004; NATARO et al., 1998). No entanto, devido à plasticidade do genoma e à transferência horizontal de genes, esses genótipos deram origem aos chamados patótipos híbridos, que compartilham características de diferentes tipos de *E. coli* patogênicas intestinais e extraintestinais (ABE et al., 2008; BIELASZEWSKA et al., 2011; COMERY et al., 2013; DUTTA et al., 2015; FALSETTI, 1998; GATI et al., 2019; GIOIA-Di CHIACCHIO et al., 2018; LARA et al., 2017; STEYERT et al., 2012; TOVAL et al., 2014a, TOVAL et al., 2014b).

De fato, avanços nas técnicas de genômica geraram novos conhecimentos acerca da estrutura genética de *E. coli* patogênica nos últimos anos, surgindo o termo "*E. coli* heteropatogênica", que define cepas que albergam marcadores de virulência de diferentes patótipos (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016; TOVAL et al., 2014a). Este é o caso da cepa de EAEC produtora da toxina Shiga que causou o surto de diarreia sanguinolenta e SHU na Europa em 2011 (BIELASZEWSKA et al., 2011; MELLMANN et al., 2011; RASKO et al., 2011). Da mesma forma, cepas de UPEC podem albergar genes de EAEC e cepas de EAEC podem apresentar genes característicos de UPEC, dando indícios de que essas cepas se correlacionam de alguma forma, causando doenças tanto de origem intestinal como no sistema urinário (ABE et al., 2008; FALSETTI, 1998; HERZOG et al*.,* 2014; LARA et al*.* 2017; NAZEMI et al., 2011; NUNES et al*.,* 2017; OLESEN et al., 2012; PARK et al., 2009, SOTO et al*.* 2009; TOVAL et al*.* 2014a; WALLACE-GADSDEN et al., 2007).

Ficou evidente em um estudo anterior do nosso grupo (NUNES et al., 2017) que um subgrupo de cepas de EAEC está inserido nos mesmos grupos filogenéticos de cepas de UPEC com marcadores de EAEC, apresentando, portanto, um possível papel na uropatogênese. Foi interessante observar que essas cepas de EAEC fecais com marcadores de ExPEC foram isoladas tanto de quadros de diarreia como de controles sadios.

A contribuição de fatores individuais de virulência de EAEC para infecção extraintestinal não é clara e requer análises mais detalhadas. Neste contexto, surgiu o objetivo do presente estudo avaliando *in vivo* o potencial uropatogênico de cepas de EAEC e a possível correlação com a presença de fatores de virulência desse patótipo.

Para uma análise mais detalhada, no presente estudo analisamos um grupo representativo de cepas do estudo de Nunes et al. (2017), realizando testes fenotípicos e um modelo murino de infecção ascendente do trato urinário.

Embora as cepas de EAEC sejam consideradas altamente heterogêneas em termos da presença de fatores de virulência, vários estudos indicam que as fímbrias AAFs desempenham papel fundamental na patogenicidade, mediando a adesão à mucosa intestinal e a formação de biofilme (BERNIER et al., 2002; BOISEN et al., 2008; ELIAS et al., 1999; FARFAN et al., 2008; JØNSSON et al*.,* 2017; NATARO et al., 1992; SHEIK et al*.,* 2001). Uma vez que no estudo de Nunes et al. (2017) a presença da fímbria AAF/V não havia sido pesquisada, a primeira etapa deste trabalho correspondeu a essa pesquisa, a fim de complementar o dado do perfil de fímbrias nas cepas de EAEC. Foi realizado a pesquisa de *agg5A,* que codifica a pilina de AAF/V (JØNSSON et al*.,* 2015). Essa sequência genética foi pouco frequente entre as cepas EAEC (24,2% no grupo EAEC/ExPEC+ e 18,2% no grupo EAEC/ExPEC-) e não foi detectada entre as cepas UPEC, indicando de fato a maior correlação deste gene com EAEC. Esses resultados estão de acordo com estudos sobre a presença das fímbrias AAF em coleções de EAEC, mostrando que a frequência de cada uma delas ocorre entre 10 a 20% (BOISEN et al., 2012; ELIAS et al., 2002; GIOPPO et al., 2000; JØNSSON et al*.,* 2015; LIMA et al., 2013).

Interessantemente, em 5 cepas foram detectadas simultaneamente duas variantes de AAF. Nas cepas 601-1, 3942-2, 4862-1 e 3621-2 foram detectadas AAF/III e AAF/V, enquanto que na cepa 3642-2 foram detectadas AAF/I e AAF/V. A detecção de cepas albergando *agg3A* e *agg5A* foi relatada no estudo de Jønsson et al*.* (2017), onde 3% das cepas de EAEC albergavam os genes dessas duas pilinas em um plasmídeo denominado pAAC700-09. Esse plasmídeo contém o operon completo que codifica AAF/III, bem como o operon AAF/V truncado. Somente com os dados obtidos no presente estudo não é possível afirmar que esse novo plasmídeo pAA ocorre nas cepas do presente estudo, nem mesmo que as duas pilinas sejam expressas, necessitando assim de análises fenotípicas e genotípicas mais detalhadas.

A adesão da bactéria a determinados tecidos é o primeiro passo para que a patogênese possa se estabelecer (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Especialmente no caso do uroepitélio, o qual é o principal foco do presente trabalho, a aderência ainda tem um papel determinante para tal capacidade (CHAHALES; THANASSI, 2015; LÜTHJE; BRAUNER, 2014). Segundo Siitonen (1994), a adesão

ao uroepitélio permite que as bactérias resistam à eliminação mecânica criada pelo fluxo de urina e é mediada pela interação de uma variedade de adesinas na superfície das bactérias com seus ligantes específicos encontrados nas células uroepiteliais do hospedeiro. Portanto, na etapa seguinte deste estudo foram realizados os testes qualitativos de adesão com as linhagens celulares humanas de bexiga (5637) e rim (HEK-293).

Após as análises dos resultados foi possível observar a adesão das bactérias ao epitélio renal em diferentes intensidades. Os dados aqui obtidos mostraram alta capacidade de adesão das cepas deste estudo, tanto às células epiteliais de bexiga como às células renais. Ao analisar separadamente os grupos EAEC/ExPEC+, EAEC/ExPEC- e UPEC, foi observado que a prevalência de cepas aderentes foi predominante no grupo das EAEC/ExPEC-, onde todas cepas apresentaram adesão em ambas as linhagens celulares. Já uma semelhança foi observada entre os perfis das cepas EAEC/ExPEC+ e UPEC onde foi verificado destacamento celular de 12% e 27,8%, respectivamente, em ambas os tipos celulares. Boll et al. (2013) analisando a cepa C555-91, protótipo do surto de ITU descrito na Dinamarca, também observaram adesão a células de bexiga da linhagem 5637. O presente estudo é o primeiro a avaliar um grande número de cepas de EAEC quanto à capacidade adesão a células de origem humana tanto de bexiga como de rins. Esses resultados são concordantes com um estudo prévio realizado por nosso grupo que indicaram, através de estudos filogenéticos, semelhanças entre cepas EAEC/ExPEC+ e UPEC, sugerindo que ambas podem apresentar perfis fenotípicos similares (NUNES et al. 2017).

Destacamento das monocamadas celulares foi detectado em proporções iguais tanto para a linhagem de células de bexiga, quanto para a linhagem de células de rim, sendo esse fenótipo observado pelas mesmas cepas nos dois tipos celulares. Esse fato pode ter ocorrido devido à produção de proteínas com atividades citotóxicas produzidas por essas bactérias, dentre elas as hemolisinas (BEUTIN, 1991). Assim sendo, foi realizada a pesquisa da produção de hemolisinas em todas as cepas deste estudo. De fato, foi constatada a produção de α-hemolisina nas cepas acima mencionadas, justificando assim o fenótipo de destacamento celular. O papel da α-hemolisina em doenças intestinais em humanos ainda não é bem esclarecido, porém essa característica é comumente associada a infecções extraintestinais (ELLIOT et al., 1998). Sabe-se que as *E. coli* que ascendem com sucesso ao rim expressam

vários fatores de virulência, sendo as *E. coli* albergando α-hemolisina, consistentemente isoladas em amostras de urina de pacientes com sintomas de pielonefrite (JOHNSEN et al., 2019; JOHNSON, 1991). A genética e os mecanismos de ação da α-hemolisina são bem conhecidos. O operon *hlyCABD* codifica a proteína hemolisina estrutural de 110 kDa (HlyA/α-hemolisina) e as proteínas envolvidas no seu processamento e exportação. A hemolisina não requer um receptor para se ligar às células alvo, formando um poro na célula alvo que ocasiona o fluxo livre de cátions, açúcares e água. Isso leva ao extravazamento do conteúdo intracelular e afeta o citoesqueleto e o metabolismo, o que explica o destacamento celular nos testes *in vitro* (BENZ et al., 1992; BRAUN, FOCARETA, 1991; WELCH, 1991; WELCH et al., 1992). Nas infecções extra-intestinais como as que ocorrem no trato urinário, a hemolisina tem múltiplos efeitos e funções, incluindo resistência à defesa do hospedeiro, dano tecidual e letalidade, por ação direta ou por estimulação de mediadores inflamatórios e vias de transdução de sinal (BHAKDI, MARTIN, 1991; ELLIOT et al., 1998; ERMERT et al., 1992).

A fímbria tipo 1 é a adesina mais comumente expressa por *E. coli* e é capaz de se ligar a compostos manosídicos encontrados nas glicoproteínas de muitos tecidos de mamíferos hospedeiros, tais como o do trato urinário, onde a interação ocorre via um receptor chamado uroplaquinas (DUNCAN, 1988; KLEMM; SCHEMBRI, 2000; PARKKINEN; VIRKOLA; KORHONEN, 1988; SCHEMBRI, et al. 2005). A seguinte etapa do trabalho foi então analisar a presença da fímbria tipo 1 através dos ensaios de aglutinação com *S. cerevisiae.* Após essa análise, foi observado que mais de 60% das cepas aglutinaram essa levedura, sendo um indicativo da presença da fímbria tipo 1 nessas bactérias. Ao analisar os grupos separadamente, observa-se que 72,7% das cepas EAEC/ExPEC+ aglutinaram a levedura, sendo essa prevalência maior em relação aos demais grupos. Após a realização do teste de aglutinação foram realizados ensaios de inibição da aglutinação com D-manose, mostrando que de fato esse fenótipo ocorreu em decorrência do reconhecimento da fímbria tipo 1 pelos compostos manosídicos da parede fúngica. O papel uropatogênico da fímbria tipo 1 tem sido demostrado em vários estudos, onde tem-se observado que além de desempenhar um importante papel na adesão inicial às células uroepiteliais, bactérias que a expressam infectam animais mais eficientemente do que cepas que são deficientes nessa adesina (ARONSON, et al., 1979; HULTGREN, et al., 1985;

JOHNSON, 1991; SCHAEFFER, et al., 1987; TOVAL et al., 2014a). Baseado nessas informações, todos os ensaios de adesão às células epiteliais foram realizados no presente estudo na ausência de manose, a fim de preservamos o papel da fímbria tipo 1 na interação bactéria-célula. Conforme observado neste estudo, de fato o papel da fímbria tipo 1 na adesão das cepas EAEC/ExPEC+ parece ser importante. Além disso, a capacidade de adesão às células de bexiga e rins não teve foco na determinação do padrão de adesão e sim na capacidade ou não de aderir nessas células.

A formação do biofilme contribui nas infecções persistentes, evasão da resposta imune do hospedeiro e confere maior resistência a antimicrobianos, sendo considerado importante para a patogênese em cepas de *E. coli* intestinais e extraintestinais (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008). A seguinte etapa deste estudo consistiu na análise da capacidade de produção de biofilme em superfície abiótica (poliestireno) na presença e ausência de 1% de α-D-manopiranosídeo (α-D-man). O inibidor de fímbria tipo 1 (α-D-man) foi empregado neste ensaio para avaliar o papel dessa fímbria nesse fenótipo, uma vez que esse composto não é metabolizado pelas bactérias durante a realização do ensaio.

Ao analisar todos os grupos de cepas (EAEC/ExPEC+, EAEC/ExPEC- e UPEC) em conjunto, observou-se que a formação de biofilme foi detectada em 61,3% das mesmas quando o teste foi realizado sem α-D-man. Já na presença do α-D-man o número de cepas formadoras de biofilme caiu para 54,8%, devido ao fato da inibição da fímbria tipo 1 pelo manopiranosídeo. Observando os grupos separadamente, em especial o das EAEC/ExPEC+, nota-se que a formação de biofilme foi detectada em 60,6% das cepas em ambas as condições testadas e que este fenótipo não foi inibido totalmente pela presença do α-D-man. Isto sugere que outras adesinas, além da fímbria tipo 1, possam estar envolvidas na produção de biofilme por essas cepas. Esse dado é concordante com um estudo realizado por Sheikh et al. (2001), onde o papel da fímbria tipo 1 na formação de biofilme foi avaliado em um grupo de EAEC na presença e na ausência do α-D-man, indicando que não houve diferença significativa na formação de biofilme em um teste realizado com condições semelhantes ao utilizado neste estudo. Esses autores afirmam ainda que fímbrias de adesão agregativa (AAF) podem estar relacionadas à produção de biofilme por essas cepas. De fato, Boll et al. (2013) mostraram que a capacidade de formação de biofilme em uma cepa de EAEC com potencial uropatogênico (cepa C555-91) era dependente da fímbria AAF/I.

Outros fatores podem interferir na capacidade de adesão em superfícies bióticas e abióticas das cepas de EAEC aqui avaliadas, o que tem correlação direta com a patogênese das mesmas. Dentre esses fatores deve-se considerar a possibilidade da existência de outras adesinas aqui não pesquisadas, tais como Curli, F9, fímbria tipo III, antígeno 43 e Upa, as quais tem correlação com a formação de biofilme (LÜTHJE; BRAUNER, 2014). Futuras análises de sequenciamento do genoma completo de algumas cepas do presente estudo esclarecerá o repertório de adesinas por elas apresentadas.

Com relação ao grupo das EAEC/ExPEC-, podemos observar que, tanto na presença como na ausência de α-D-man, houve uma alta capacidade de formação de biofilme pelas cepas, ou seja, 100 e 72,7% respectivamente. Isso indica que as cepas desse conjunto formam biofilme abundantemente, não por uma ação específica da fímbria tipo 1, mas por outras adesinas de EAEC.

Para o grupo das UPEC foi observada menor capacidade de formação de biofilme em comparação aos demais grupos (38,9%), mesmo sem a presença do α-D-man. Ao se comparar essa capacidade aos valores obtidos com as cepas de EAEC (com ou sem marcadores de ExPEC), ficou claro que essa característica fenotípica é mais pronunciada e característica do patótipo de EAEC (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998; SHEIKH et al., 2001; WAKIMOTO et al., 2004).

Relatos prévios na literatura indicam um possível papel para a fímbria tipo 1 na capacidade de bactérias produzirem biofilme, diferentemente dos dados obtidos no presente estudo (PRAT; KOLTER, 1998; SCHEMBRI; KLEMM, 2001). No entanto, estudos mais recentes indicam que os mecanismos envolvidos em adesão e produção de biofilme são muito mais complexos do que a presença de uma única adesina. De fato, em um estudo realizado por Schembri, Kjærgaard e Klemm (2003) a regulação da capacidade de formação de biofilme em *E. coli* estava diretamente relacionada à presença do antígeno 43, uma adesina que por sua vez tem sua expressão e atividade reguladas pela presença de fímbria tipo 1 e cápsula. Em um trabalho posterior o mesmo grupo indicou que a função da fímbria tipo 1 de *Klebsiella pneumoniae* mostrou-se afetada pela presença de cápsula em sua superfície, sem alteração na expressão da adesina (SCHEMBRI et al., 2005).

Em suma, os dados aqui apresentados indicam a presença de outros fatores envolvidos nos fenótipos de adesão e formação de biofilme, tais como cápsulas ou

ainda alguns reguladores transcricionais inibitórios da expressão da fímbria tipo 1, como o LrhA (BLUMER et al., 2005; NUNES et al., 2017).

Um ponto a ser ressaltado em nosso estudo é a presença de cepas de EAEC classificadas como ExPEC em controles assintomáticos. Neste estudo 14 cepas isoladas de controles apresentaram essa característica. Isso indica a possível colonização intestinal assintomática por cepas de EAEC com potencial uropatogênico. A partir dessa colonização a cepa pode entrar em contato com o trato urinário, ascendendo à uretra e causando ITU (MANGES; JOHNSON, 2012; NUNES et al., 2017; OKHUYSEN; DUPONT, 2010; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; STEINER et al., 2000).

As infecções no trato urinário podem ser monitoradas quantitativamente, determinando as cargas bacterianas em diferentes tempos pós-infecção. Além disso, a arquitetura simples da bexiga e rim permite a observação da progressão da doença e da virulência uropatogênica usando uma variedade de técnicas microscópicas (HUNG; DODSON; HULTGREN, 2009). Objetivando melhor caracterizar o potencial uropatogênico das cepas deste estudo, um conjunto representativo de cepas foi avaliado em um modelo murino de infecção ascendente do trato urinário, empregando camundongos da linhagem C57BL/6.

Para verificar se as cepas EAEC/ExPEC+ seriam capazes de colonizar o uroepitélio, e se pelo fato das mesmas possuírem marcadores característicos de ExPEC, elas podem infectar mais eficientemente o trato urinário, foram selecionadas cinco cepas com marcadores de ExPEC e também quatro cepas de EAEC sem os tais marcadores (Tabela 1). Estas cepas foram escolhidas com base em suas características genotípicas, além representarem os diferentes tipos de AAF encontrados em EAEC. Não obstante, em relação às cepas EAEC/ExPEC+ foi levado em consideração os grupos filogenéticos obtidos do estudo de Nunes et al. (2017), sendo a cepa 301-1 pertencente ao cluster filogenético da cepa protótipo EAEC 042, a cepa 3291-7 pertencente ao cluster da cepa protótipo UPEC CFT073 e as cepas 17-2, 41-2 e 3682-2 pertencente ao mesmo cluster filogenético da cepa EAEC C555-91 (O78:H10) que causou um surto de ITU na Dinamarca (OLESEN, et al., 2012) (Figura 5). Para fins comparativos, quatro cepas EAEC/ExPEC- (EAEC 042, 3301-1,3531-3 e 3861-2), que não fazem parte da árvore filogenética descrita por Nunes et al. (2017), também foram selecionadas para o modelo animal de ITU.

De fato, as cepas EAEC/ExPEC+ foram capazes de colonizar a bexiga e rins mais eficientemente do que as cepas EAEC/ExPEC-. Com exceção da cepa EAEC/ExPEC+ 3682-2, que colonizou apenas a bexiga, todas as demais cepas desse grupo foram capazes de infectar rins e bexiga. Essa capacidade atingiu os níveis médios de colonização entre 10^3 e 10^5 UFC/g de bexiga e entre 10 e 10^2 UFC/g de rim. Para fins de análises estatísticas, esses valores foram comparados à colonização resultante da inoculação da cepa de *E. coli* K-12 MG1655. A literatura relata médias de colonização basal da bexiga por volta de 10^4 UFC/g quando essa cepa é inoculada na bexiga de camundongos (TOVAL et al., 2014b).

Na colonização da bexiga, para as cepas 41-2 e 3291-7 não houve diferenças estatisticamente significativas em comparação à colonização pela cepa MG1655. Por outro lado, a cepa MG1655 foi incapaz de colonizar os rins, fato esse detectado em todas as cepas EAEC/ExPEC+, com exceção da 3682-2. A literatura é clara ao mostrar que cepas que causam somente cistite em humanos são muitas vezes eliminadas facilmente pelo organismo, principalmente quando se trata de um indivíduo saudável. Por outro lado, cepas que não são eliminadas durante a infecção na bexiga e são capazes de ascender aos rins, têm grandes chances de causar sérios danos aos tecidos e muitas vezes podem ser fatais se tais infecções não foram rapidamente tratadas e evoluírem para o quadro de urosepse (MARRS; ZHANG; FOXMAN, 2005).

Conforme mencionado anteriormente, a cepa C555-91 (O78:H10) foi escolhida como representativa do surto de ITU ocorrido na Dinamarca (BOLL et al., 2013). Essa cepa não possui fatores de virulência de ExPEC em seu background genético, porém foi isolada de uma criança de 4 anos de idade com diarreia e apresentando um histórico de ITU recorrente. No estudo de Boll et al. (2013) foi mostrado que a fímbria AAF/I presente nessa cepa não era responsável pela infecção na bexiga em um modelo murino de ITU. Os resultados do nosso estudo estão de acordo com os dados de Boll et al. (2013), onde aparentemente os diversos tipos de AAF analisados (I, II, III, IV e V) não foram relacionadas à capacidade de infecção, pois a cepa EAEC/ExPEC+ 3291-7 não possui nenhum tipo de AAF e, mesmo não causando infecção a níveis estatisticamente significativos na bexiga, apresentou nos rins contagens bacterianas superiores aos valores da cepa protótipo de UPEC CFT073 (Figura 10).

Todas as cepas testadas no modelo murino de ITU foram boas formadoras de biofilme e com exceção da cepa de EAEC/ExPEC+ 3291-7, todas expressaram a

fímbria tipo 1 (Figura 10). Conforme discutido anteriormente, aparentemente a presença dessa fímbria não influencia na capacidade de produção de biofilme em cepas EAEC. Não obstante, podemos observar que a fímbria tipo 1 não exerceu uma atividade determinante para a ITU no modelo animal testado, visto que tanto as cepas EAEC/ExPEC+ e/ou EAEC/ExPEC- possuem essa adesina e mesmo assim, somente as cepas que possuíam os marcadores de ExPEC colonizaram o uroepitélio com maior eficiência. Esse dado não é concordante com a afirmação feita por Boll et al. (2013), ao descrever que na bexiga do camundongo a aderência é mediada principalmente por fímbria tipo 1. No presente estudo, nossos resultados permitem afirmar que essa adesina exerce um papel colaborativo na uropatogênese, porém não é determinante.

Já foi mencionado que no estudo de Nunes et al. (2017) foi gerado um filograma com os dados de MLST obtidos com as cepas de EAEC/ExPEC+. As cepas foram distribuídas em três grupos principais, o primeiro relacionado a cepa EAEC 042, o segundo à cepa CFT073 e o terceiro à cepa C555-91 (O78:H10). É de grande interesse o terceiro cluster, o qual apresentava um conjunto de cepas de EAEC/ExPEC+ e UPEC com marcadores de EAEC, todos do filogrupo A e a maioria pertencente ao ST10; juntamente às cepas de EAEC 17-2 e a cepa C555-91, causadora do surto de ITU na Dinamarca (OLESEN et al., 2012).

Baseado nessas informações, das cinco cepas EAEC/ExPEC+, selecionamos as cepas 17-2, 41-2 e 3682-2 do filogrupo A e ST10, pertencentes ao terceiro cluster, para a análise no modelo murino de ITU. Desse grupo, destacam-se os resultados com a cepa EAEC 17-2, que foi a cepa que apresentou os maiores níveis de infecção, comparáveis aos níveis da cepa protótipo de UPEC CFT073, com picos de infecção próximos a 10^8 UFC/g na bexiga e 10^{10} UFC/g nos rins (Figura 10).

A cepa de EAEC 17-2 é a EAEC protótipo da fímbria AAF/I, isolada de um caso de diarreia infantil apresentando fatores de virulência característicos de EAEC (NATARO et al., 1992). Chama a atenção essa cepa apresentar uma série de características de UPEC, tais como a produção de α-hemolisina e citodestacamento em cultura de células (GOMES, ABE, MARQUES, 1995), ser classificada como ExPEC pelos critérios de Johnson et al. (2003), pertencer ao filogrupo A e ao ST10. Várias dessas características são compartilhadas com a cepa C555-91, causadora do surto de ITU na Dinamarca (OLESEN et al., 2012). Além disso, essa cepa foi a única cepa a causar uma infecção estatisticamente significativa tanto na bexiga como nos

rins, demonstrando ter uma alta capacidade de causar infecção no trato urinário, mesmo sendo uma cepa de origem fecal. Essa informação reforça a hipótese de que a presença de marcadores de ExPEC pode potencializar a virulência de uma cepa EAEC, permitindo a mesma colonizar sítios extraintestinais como o trato urinário com maior eficiência.

No presente estudo observamos mais uma vez a importância do ST10, visto que no modelo animal testado, a cepa 17-2 que foi a única que causou infecção a níveis estatisticamente significativos tanto na bexiga como nos rins, pertence a esse ST. Este estudo vai de encontro a outros relatos da literatura onde o ST10 foi encontrado em alta frequência em várias coleções de *E. coli* (BANERJEE et al.,2013; CHATTAWAY et al., 2014; DALLMAN et al., 2014; LARA et al. 2017; OKEKE et al., 2010; OLESEN et al., 2012), indicando que cepas pertencentes a este ST específico se correlacionam e podem causar tanto infecções intestinais quanto infecções do trato urinário.

Interessantemente, observamos que apenas duas cepas EAEC/ExPEC- foram capazes de colonizar a bexiga do animal, sendo elas a 042 e 3531-3 (Figura 10). A cepa de EAEC 042 é a protótipo da fímbria AAF/II. Ela foi isolada de uma criança com diarreia aguda no Chile (NATARO et al., 1987) e desde então tem contribuído para o estudo de fatores de virulência e patogenicidade da diarreia ocasionada por EAEC (CHAUDHURI et al., 2010; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2017; OKHUYSEN; DUPONT, 2010). No presente estudo foi observado que a cepa EAEC 042 foi capaz de colonizar somente a bexiga a níveis não estatisticamente significativos se comparados à cepa MG1655 (Figura 10). Nossos dados discordam do recente estudo realizado por Mendelez-Avalos et al. (2019), que relataram uma análise da colonização bacteriana e expressão de RNAm de citocinas pro-inflamatórias no trato urinário de camundongos da linhagem BALB/c infectados com inóculo de $5x10^7$ UFC da cepa protótipo EAEC 042. Após 7 dias da inoculação, esses autores detectaram valores médios de $4x10^5$ UFC/g de bexiga e $6x10^4$ UFC/g de rins, sugerindo que a cepa 042 possui potencial uropatogênico. Esses valores destoam grandemente das médias obtidas no presente trabalho, onde a cepa 042 apresentou valores não significativos próximos a $1x10^2$ UFC/g somente na bexiga. Essas discordâncias podem estar relacionadas às diferenças nos protocolos quanto às linhagens de camundongos (BALB/c x C57BL/6), inóculos ($5x10^7$ x $1x10^9$ UFCs) e períodos de infecção (7 x 3 dias).

A cepa EAEC/ExPEC- 3531-3, colonizou a bexiga animal com valores significativos próximos a 10^4 UFC/g (*P*=0.0005, Figura 10). Essa cepa não possui nenhum dos marcadores característicos de ExPEC (JOHNSON et al*.,* 2003; NUNES et al*.,* 2017), porém alberga o gene que codifica a toxina Sat que tem participação na uropatogênese de UPEC (GUYER et al*.* 2000; GUYER et al*.,* 2002; LÜTHJE; BRAUNER, 2014).

Sat é uma proteína citotóxica pertencente ao grupo das SPATEs, capaz de ocasionar vacuolização do citoplasma de células de bexiga e rins humanos, descrita inicialmente em um estudo com cepas de UPEC, mas também detectada em cepas de EAEC (ANDRADE et al., 2017; BOISEN et al., 2009; BOISEN et al., 2012; HEBBELSTRUP JENSEN et al*.,* 2014). Por outro lado, é interessante observar que a cepa EAEC/ExPEC- 3531-3 não foi capaz de colonizar os rins dos camundongos (Figura 10). Esse fato chama a atenção, pois em outro estudo empregando um modelo animal de ITU semelhante, Sat teve maior potencial de causar efeitos nos rins, causando danos específicos aos glomérulos e aos túbulos proximais, enquanto não houve danos na bexiga (GUYER et al*.,* 2002).

Outros estudos afirmam que SPATEs como Sat e Pic têm sido encontradas tanto em EAEC como ExPEC, mas sem aparente relação com a colonização no modelo animal de ITU (BOLL *et. al.* 2013, GUYER et al*.,* 2002, HEMER et al*.*, 2004). Dessa forma, a colonização da bexiga pela cepa 3531-3 poderia estar relacionada a outros fatores, e essa infecção não teria sido capaz de ascender aos rins devido à falta de fatores de virulência importantes, como a fímbria P, adesinas Afa/Dr e F1C/S. Essa hipótese é concordante com um estudo realizado por Lüthje e Brauner (2014), onde foi feito um levantamento dos principais fatores de virulência envolvidos na uropatogênese (incluindo fímbria P, adesinas Afa/Dr, F1C/S entre outros) e sua interação com o hospedeiro; além do estudo de Johnson et al. (1998) que mostrou que cepas que causam infecção nos rins persistem no trato urinário como resultado da expressão dessas adesinas específicas que promovem a colonização do uroepitélio.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem levantar a hipótese de que uma cepa EAEC sem marcadores de ExPEC pode eventualmente colonizar a bexiga, entretanto essas cepas se comportam como como algumas cepas de UPEC de baixa virulência, que colonizam a bexiga mas são eliminadas pelo organismo em períodos mais longos do que o analisado no presente estudo. Em concordância com essa

afirmação, estão os dados de um estudo que analisou as diferenças entre cepas de UPEC isoladas de casos de cistite e pielonefrite (JOHNSON et al, 1998). Esses autores mostraram que cepas que colonizavam e/ou infectavam somente a bexiga do animal, ocasionavam alterações histológicas, porém eram eliminadas mais facilmente do trato urinário. Por outro lado, as cepas oriundas de pielonefrite eram mais resistentes e ainda persistiam colonizando após 7 dias pós-inoculação (JOHNSON et al, 1998). Outros estudos afirmam ainda que cepas que causam infecção somente na bexiga têm menor capacidade de mediar a hemaglutinação manose-resistente e apresentam fímbria P com menor frequência (ARTHUR et al.,1989; SANDBERG et al*.,* 1988; STAPLETON; MOSELEY; STAMM, 1991).

Por fim nossos dados mostram que cepas fecais de EAEC com um *background* genético contendo marcadores de ExPEC são capazes de colonizar o uroepitélio de forma mais eficiente e assim ocasionar cistite e pielonefrite no modelo murino utilizado. Dessa forma, cepas de EAEC fecais que possuem essas combinações de genes apresentam potencial uropatogênico. Embora albergando o cólon distal humano, que é o seu ambiente natural, ao atingirem a região periuretral seriam capazes de ascender, infectar o epitélio da bexiga e em alguns casos atingir e infectar os rins. Se a infecção não for resolvida, ela pode se disseminar para a corrente sanguínea levando ao quadro de urosepse. Esses dados são relevantes, porém ainda são poucos os estudos avaliando a capacidade de infecção do trato urinário por EAEC, necessitando-se assim de um melhor esclarecimento de como esse processo ocorre e como monitorar essas infecções de forma mais eficaz.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Cepas fecais de EAEC isoladas de casos ou controles apresentam potencial uropatogênico, pois são capazes de:
  - aderir em células humanas cultivadas de bexiga e rins,
  - formar biofilme com envolvimento ou não da fímbria tipo 1,
  - causar cistite e pielonefrite no modelo de infecção ascendente do trato urinário de camundongos C57BL/6;
- ✓ Cepas EAEC com marcadores genéticos de ExPEC são capazes de causar ITU mais eficientemente do que cepas que não possuem tais marcadores;
- ✓ A presença desse subgrupo de EAEC nos intestinos, tanto no curso de uma doença diarreica quanto em carreadores assintomáticos, pode representar um potencial risco para a ITU.

REFERÊNCIAS*

ABE, C.M. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrheagenic *E. coli*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 397-406, 2008.

ABREU, A.G. et al. The serine protease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 212, n. 1, p. 106-115, 2015.

AL-HASANI, K. et al. Genetic organization of the *she* pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. **Microb. Pathog.**, v. 30 p. 1-8, 2000.

AL-HASANI, K. et al. The immunogenic SigA enterotoxin *Shigella flexneri* 2a binds HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. **PLoS One**, v. 4, p. 1-5, 2009.

ALM, E. W.; WALK, S. T.; GORDON, D. M. The niche of *Escherichia coli* in population genetics of bacteria. ASM Press. p. 107–123, 2011.

AMORIM, J. H. et al. Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches. **F1000 Res.,** v. 3, p. 74-82, 2014.

ANDRADE, F.B. **Interação da Serino Protease SepA de *Escherichia coli* enteroagregativa com células epiteliais *in vitro***. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ANDRADE, F.B.; GOMES, T.A.T.; ELIAS, W.P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods**., v. 106, p.16-18., 2014.

ARONSON, M. et al. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl α-D-mannopyranoside. **J. Infect. Dis.**, v. 139, p. 329-332, 1979.

ARTHUR, M. et al. Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 2, p. 303-313, 1989.

BAHRANI-MOUGEOT, F.K. et al. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. **Molec. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1079-1093, 2002.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2018.

BANDO, S.Y. et al. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 105, p. 786-91, 2010.

BANERJEE, R. et al. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, p. 5912-5917, 2013.

BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 1249-1251, 1990.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J. M. *Escherichia coli* biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 322, p. 249–289, 2008.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z. et al**.** SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. **Microbiol. ,** v. 144, p. 1815-1822, 1998.

BENZ, R. et al. Haemolysin of *Escherichia coli*: comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins. **FEMS Microbiol. Immun.**, v. 5, n. 1-3, p. 55-62, 1992.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C.. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4302-4311, 2002.

BERNSTEIN, H. D. Are bacterial ‘autotransporters’ really transporters? **Trends Microbiol.**, v. 15, p. 441-447, 2007.

BEUTIN, L. The different hemolysin of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immunol**. v.180, p.167-182, 1991.

BHAKDI, S.; MARTIN, E. Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 9, p. 2955-2962, 1991.

BOISEN, N. et al. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, n. 3, p. 431-444, 2012.

BLASER, A. R.; DEANE, A. M.; FRUHWALD, S. Diarrhoea in the critically ill. **Curr.Opin. Crit. Care**., v. 21, p., 142–153, 2015.

BLUM, G. et al. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and α-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. **FEMS Microbiology Letters**, v. 126, n. 2, p. 189-195, 1995.

BLUMER, C. et al. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. **Microbiol.**, v. 151, p. 3287-3298, 2005.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3281-3292, 2008.

BOISEN, N. et al. High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009.

BOLL, E. J. et al. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. **Infect. Immun.,** v. 81, p. 1164-1171, 2013.

BRAUN, V.; FOCARETA, T. Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). **Critic. Rev. Microbiol.**, v. 18, n. 2, p. 115-158, 1991.

BROOKS, J. T. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. **J. Infect. Dis.,** v. 192, p. 1422–1429, 2005.

BRUMBAUGH, A. R.; MOBLEY, H. L. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. **Expert. Rev. Vaccines**., v. 11, p. 663-676, 2012.

BUERIS, V. et al. Detection of *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

CHAHALES, P.; THANASSI, D.G. Structure, function, and assembly of adhesive organelles by uropathogenic bacteria. **Microbiol. Spect.**, v. 3, n. 5, 2015.

CHATTAWAY, M.A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* have evolved independently as distinct complexes within the *E. coli* population with varying ability to cause disease. **PLoS One.**, v. 9, p. 11, 2014.

CHAUDHURI, R. R. et al. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, e8801, 2010.

CHIACCHIO, Gioia-Di et al. Novel hybrid of typical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga-Toxin-producing *E. coli* (tEPEC/STEC) emerging from pet birds. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 2975, 2018.

CLERMONT, O. et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environ. Microbiol.**, 2019.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Env. Microbiol. Rep.,** v. 5, p. 58-65, 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 66, p. 4555–4558, 2000.

COBELJIĆ, M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect.,** v. 117, p. 11-16, 1996.

COMERY, R. et al. Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at

slaughter and in retail meats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, n. 12, p. 3892-3896, 2013.

CONNELL, I. et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc. Nat. Acad. Scienc.**, v. 93, n. 18, p. 9827-9832, 1996.

CRAVIOTO, A. et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95–99, 1979.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 26, p. 822-880, 2013.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 8, p. 26–38, 2010.

CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **J. Infect.**, v. 71, p. 615-626, 2015.

DALLMAN, T. J. et al. An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. **PLoS One**, v. 9, p. 98-103, 2014.

DAUTIN, N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. **Toxins (Basel).,** v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DAWSON, K. G.; EMERSON, J. C.; BURNS, J. L. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. **Pediatr. Infect. Dis. J.,** v. 18, p. 816-822, 1999.

DJAFARI, S. et al. Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 25, p. 771-784, 1997.

DUDLEY, E.G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microb.**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006.

DUNCAN, J.L. Differential effect of Tamm-Horsfall protein or adherence of *Escherichia coli* to transitional epithelial cells. **J. Infect. Dis.** V. 158, p.1379-1382, 1988.

DUTTA, P.R. et al. Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 7105-7113, 2002.

DUTTA, S. et al. Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. **Internat. J. Med. Microbiol.**, v. 305, n. 1, p. 47-54, 2015.

ELIAS, W.P. et al. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 6, p. 1779-1785, 1999.

ELIAS, W. P. et al. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiology & Infection**, v. 129, n. 1, p. 49-55, 2002.

ELLIOTT, S.J. et al. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 5, p. 2040-2051, 1998.

ERMERT, L. et al. Induction of severe vascular leakage by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rabbit lungs. **Lab. Invest.: J. Tech. Meth. Pathol.**, v. 66, n. 3, p. 362-369, 1992.

ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.,** v. 66, p. 3155-3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: a pathogen bridging the North and south. **Curr. Trop. Med. Rep.,** v. 1, p. 88-96, 2014.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.,** v. 66, p. 281-298, 2012.

FALSETTI, I.N. **Identificação de caracteristicas fenotipicas e genotipicas de *Escherichai coli* enteroagregativa (EAEC) em amostras de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Microbiologia)- Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.

FARFAN, M.J.; INMAN, K. G.; NATARO, J.P. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. **Infect. and Immun.**, v. 76, n. 10, p. 4378-4384, 2008.

FIHN, S. D. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. **N. Engl. J. Med**., v. 349, p. 259–266, 2003.

FISCHER WALKER, C.L. et al. Does childhood diarrhea influence cognition beyond the diarrhea-stunting pathway? **PLoS One**, v 10 p. e47908, 2012.

FLECKENSTEIN, J.M. et al. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes Infect**.;12:89–98, 2010.

FLORES-MIRELES, A.L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat. Ver. Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 269, 2015.

FORSYTH, V.S. et al. Rapid growth of uropathogenic *Escherichia coli* during human urinary tract infection. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e00186-18, 2018.

GATI, Noble Selasi et al. Origin and evolution of hybrid Shiga toxin-producing and uropathogenic (STEC/UPEC) *Escherichia coli* of sequence type 141. **J. Clin. Microbiol.**, p. JCM. 01309-19, 2019.

GBD (GLOBAL BURDEN OF DIARRHOEAL DISEASES COLLABORATORS). Estimates of global, regional, national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 17, p. 909–948, 2017.

GIOPPO, N.M.R. et al. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated

from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, n. 2, p. 293-298, 2000.

GOMES, T. A.T.; ABE, C. M.; MARQUES, L. R. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. **J Clin Microbiol**., v. 33, p. 33-64, 1995.

GOMES, T.A.T. et al. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T.A.T. et al. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T.A.T. et al. Diarrheagenic *Esherichia coli.* **Braz. J. Microb.**, v.47, p. 3-30, 2016.

GUERRANT, R. L. et al. The impoverished gut- a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.,** v. 10, p. 220-229, 2013.
GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; ARCINIEGA, I.; NAVARRO-GARCIA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 115–123, 2008.

GUYER, D. M. et al. Indentification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli.* **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 53-66, 2000.

GUYER, D.M. et al. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4539-4546, 2002.

HARRINGTON, S. M. et al. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli.* **Cell Microbiol.** v. 7, p. 1565–1578, 2005.HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HARRINGTON, S.M. et al. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 2465-2473, 2009.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Rev.**,v. 27, p. 614-30, 2014.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. et al. Genetic virulence profile of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from Danish children with either acute or persistent diarrhea. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 230, 2017.

HEIMER, S.R. et al. Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 72, n. 1, p. 593-597, 2004.

HENDERSON, I. R. et al. P. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HENDERSON, I. R. et al. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.,** v. 68, p. 692–744, 2004.

HERNANDES, R.T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HERZER, P. J. et al. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single- stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.,** v. 172, p. 6175-6181, 1990.HERZOG, K. et al. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. **Infection.,** v. 42, p. 441-444, 2014.

HULL, S.I. et al. Genetics of hemolysin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 151, n. 2, p. 1006-1012, 1982.

HULTGREN, S.J. et al. Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. **Infect. Immun**. v. 50, p. 370-377, 1985.

HUNG, C.S; DODSON, K.W.; HULTGREN, S.J. A murine model of urinary tract infection. **Nat. Prot.**, v. 4, n. 8, p. 1230, 2009.

HVIDBERG, et al. Development of a long-term ascending urinary tract infection mouse model for antibiotic treatment studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 156-163, 2000.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Pesquisa nacional por amostra de domicílios.** v. 31, p. 1-135, 2011.

INGERSON-MAHAD, M.; REID, A. *E. coli*: good, bad & deadly. **American Academy of Microbiology**, p.1-13, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Munic: mais da metade dos municípios brasileiros não tinha plano de saneamento básico em 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22611-munic-mais-da-metade-dos-municipios-brasileiros-nao-tinha-plano-de-saneamento-basico-em-2017> Acesso em: 09 dez de 2018.

ITOH, Y. et al. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable :H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2546-2550, 1997.

JENSEN, K. F. The *Escherichia coli* K-12" wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 11, p. 3401-3407, 1993.

JOHNSEN, Nanna et al. α-Haemolysin production, as a single factor, causes fulminant sepsis in a model of *Escherichia coli*-induced bacteraemia. **Cell. Microbiol.**, v. 21, n. 6, p. e13017, 2019.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 80-125, 1991.

JOHNSON, D.E. et al. Comparison of *Escherichia coli* strains recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 7, p. 3059-3065, 1998.

JOHNSON, J. R. et al. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 47, p. 2161-2168, 2003.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.,** v. 295, p. 383-404, 2005.

JØNSSON, R. et al. A novel Aggregative Adherence Fimbriae (AAF/V) of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). **Infect. Immun.,** v. 83, p. 1396-1405, 2015.

JØNSSON, R. et al. A novel pAA virulence plasmid encoding toxins and two distinct variants of the fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 263, 2017.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli.* **Nat. Rev. Microbiol.,** v. 2, p. 123-140, 2004.

KEUSCH, G. T. et al. Implications of acquired environmental enteric dysfunction for growth and stunting in infants and children living in low- and middle-income countries. **Food. Nutr. Bull.,** v. 34, p. 357-364, 2013.

KHAIRY, Rasha M. et al. Phylogenic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0222441, 2019.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int. Med. Microbiol.**, v. 290, p. 27-35, 2000.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet. v.** 382 p. 209-22. 2013.

LARA, F.B., et al. Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 146, 2017.

LECOINTRE, G. et al. *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Mol. Biol. Evol.,** v. 15, p. 1685-1695, 1998.

LEYTON, D. L. et al. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli:* similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6307–6319, 2003.

LIMA, I.F. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case–control study among children from north-eastern Brazil. **J. Medical Microbiol.**, v. 62, n. Pt 5, p. 683, 2013.

LÜTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. In: **Advac. Microb. Physiol.** Academic Press, p. 337-372, 2014.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, p. 608, 2004.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, p. 712-719, 2012.

MARONCLE, N. M. et al. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6124-6134, 2006.

MARRS, C. F.; ZHANG, L.; FOXMAN, B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. **FEMS microbiol. letters**, v. 252, n. 2, p. 183-190, 2005.

MELENDEZ-AVALOS, A. et al. Analysis of inflammatory cytokine expression in the urinary tract of BALB/c mice infected with Proteus (P.) mirabilis and enteroaggregative Escherichia (E.) coli (EAEC) strains. **F. Microbiol.**, p. 1-10, 2019.

MELLMANN, A. et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22751, 2011.

MELLIES, J. L. et al. espC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin**. Infect. Immun.**, v. 69, p. 315-324, 2001.

MELTON-CELSA, A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiol Spectr**. 2(3). EHEC-0024-2013,2014.

MOBLEY, H. L. et al. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. **Infec. Immun.**, v. 58, n. 5, p. 1281-1289, 1990.

MOBLEY, H.L; DONNENBERG, M.S; HAGAN, E.C. Uropathogenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, 2009.

MORENO, A. C. et al. Recognition of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by dendritic cells: distinct dendritic cell activation states. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**., v. 107 p. 138-41. 2012.

MORENO, A. C.; FERREIRA, L. G.; MARTINEZ, M. B. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 301, p. 156-163, 2009.

MORIN, N.; SANTIAGO, A.E.; ERNST, R.K.; GUILLOT, S.J.; NATARO, J.P. Characterizationof the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** V.81, p. 122–132, 2013.

MULVEY, M.A.; SCHILLING, J.D.; HULTGREN, S.J. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 7, p. 4572-4579, 2001.

MUNHOZ, D.D. et al. Distribution of Major Pilin Subunit Genes Among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Influence of Growth Media on Expression of the ecp Operon. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 942, 2018.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p.142-201, 1998.

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.**, v. 4, p. 251–261, 1998.

NATARO, J.P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J.P. et al. Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Demonstrated. **J. Infect. Dis.**, v. 171, n. 2, p. 465-468, 1995.

NATARO, J.P., et al*.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 829-831, 1987.

NAVARRO-GARCIA, F. et al. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. **Infect. Immun.**, v. 78 p. 4101-4119, 2010.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v. 2, p. 13-24, 2011.

NAVARRO-GARCIA, Fernando. *Escherichia coli* O104: H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. In: **Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing E. coli**. ASM, p. 533-539, 2015.

NAZEMI, A. et al. Distribution of pathogenic genes *aatA, aap, aggR*, among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and their linkage with *StbA* Gene. **Indian J. Microbiol.**, v. 51, p. 355–358, 2011.

NORINDER, B. S. et al. Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire?. **Microb. Path.**, v. 52, n. 1, p. 10-16, 2012.

NUNES, K. O. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. **Pathog. Dis.**, v. 75, n. 8, 2017.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 478-483, 2011.

OKEKE, I.N et al. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. **PLoS One**., v. 23, p. e14093, 2010.

OKEKE, I.N. et al. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 252-260, 2000.

OKHUYSEN, P.C.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **J. Infect. Dis**. , v. 202, n.4, p. 503-505, 2010.

OLESEN, B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection**. J. Clin. Microbiol.,** v. 50, p.3703–3711, 2012.

PARHAM, N. J. et al. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett**., v.15, p. 73-83, 2004.

PARK, H. K. et al. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. **Scand. J. Urol. Nephrol**., v. 43, p. 51–57, 2009.

PARKKINEN, J.; VIRKOLA, R.; KORHONEN, T.K. Identification of factors in human urine that inhibit the binding of *Escherichia coli* adhesins. **Infect. Immun.**, v.56, p.2623-2630, 1988.

PEREIRA, A.L. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 366 –374, 2007.

PETRI, W. A. et al. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.,** v. 118, p. 1277-1290, 2008.

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Front. Microbiol.**, v. 19, p. 3-9, 2012.

PRATT, L.A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type 1 pili. **Mol. Microbiol**, v. 30, p.285-293, 1998.

PUPO, G. M.; LAN, R.; REEVES, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 97, p. 10567–10572, 2000.

RASKO, David A. et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic–uremic syndrome in Germany. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 8, p. 709-717, 2011.

REGUA-MANGIA, A.H. et al. Molecular characterization of uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **J. Bas. Microbiol**., v. 50, p. 107-115, 2010.

RILEY, L.W. et al. Hemorragic colitis associated with a rare *Escherichia coli serotype*. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

RILEY, L.W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, p. 380–390, 2014.

RODRIGUES et al. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 7, p. 2680-2686, 1996.

RUIZ-PEREZ, F. et al. Serine protease autotransporters from Shigella flexneri and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**,v. 108, p. 12881-12886, 2011.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 71, p. 745-770, 2014.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.,** v. 181, p. 1753–1754, 2000.

SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clin. Microbiol. Infect.**,v. 12, p. 880– 886, 2006.

SANDBERG, T. et al. Virulence of *Escherichia coli* in relation to host factors in women with symptomatic urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, n. 8, p. 1471-1476, 1988.

SARANTUYA, J. et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p.133-139, 2004.

SCALETSKY, I. C. A. et al. A localized adherence pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

SCALETSKY, I.C.A; SILVA, M.L.M; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

SCAVIA, G., et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 1141-1146, 2008.

SCHAEFFER, A. J., et al. Relationship of type 1 pilus expression in *Escherichia coli* to ascending urinary tract infections in mice. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 373-380 ,1987.

SCHEMBRI, M. A.; KLEMM, P. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel *fimH* variants and ramifications for virulence. **Infect. Immun.**, v.69, p. 1322-1328, 2001.

SCHEMBRI, M.A. et al. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun**., v. 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.

SCHEMBRI, M.A.; KJÆRGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Molec. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 253-267, 2003.

SCHEUTZ, F. et al. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. **E. Surveill.**, v**.** 16, p. 24, 2011.
SCHEUTZ, F. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli.* **Microbiol. Spectr.,** v. 2, p. 1-15, 2014.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia castellani* and *Chalmers 1919.* Em: GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** The Proteobacteria Part B. v. 2 p. 607-624. 2005.

SHAMIR, E.R. et al. Nitazoxanide inhibits biofilm production and hemagglutination by enteroaggregative *Escherichia coli* strains by blocking assembly of AafA fimbriae. **Antimicr. Ag. Chemother.**, v. 54, n. 4, p. 1526-1533, 2010.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n. 9, p. 1329-1337, 2002.

SHEIKH, J. et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli.* **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 983-997, 2001.

SIDOTI, F. et al. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. **J. Infect. Dev. Ctries**., v. 6, p. 551-561, 2015.

SIITONEN, A. What makes *Escherichia coli* pathogenic?. **Ann. Med**., v.26, p. 229-231,1994.

SITTERLEY, G. Poly-L-Lysine Cell Attachment Protocol. **BioFiles**, v. 3, p. 12, 2008.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis**., v. 4, p. 134-163, 2007.

SOTO, S.M., et al. Prevalence of the *set-1B* and *astA* genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. **Micorb. Pathog.** v. 47, p. 305-307, 2009.

STAPLETON, A.; MOSELEY, S.; STAMM, W. E. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* isolates causing first-episode and recurrent cystitis in women. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 4, p. 773-779, 1991.

STEINER et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1769-1777, 2000.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891–899, 2007.

STEYERT, S. R. et al. Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 133, 2012.

TADDEI, C.R. et al. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children**. FEMS Microbiol. Lett.**, v. 227, p.249 –253, 2005.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**,v. 8, p. 207-217, 2010.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol. Immun.**, v. 54, n. 6, p. 320-329, 2010.

TOVAL, Francisco et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, n. 2, p. 407-418, 2014a.

TOVAL, F. et al. Characterization of urinary tract infection-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 11, p. 4631-4642, 2014b.

TRABULSI, L.R.; KELLER R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.5, p. 508-513, 2002.

UNHANAND, M. et al.Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. **J. Pediatr.,** v. 122, p. 15-21, 1993.

VEJBORG, R. M. et al. Comparative genomics of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infections. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 10, p. 3268-3278, 2011.

VISWANATHAN, V.K.; HODGES, K.; HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhea. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 110-119, 2008.

WAKIMOTO, N. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 687-690, 2004.

WALLACE-GADSDEN, F. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* related to uropathogenic clonal group A. **Emerg. Infect. Dis.**,v. 13, p. 757-760, 2007.

WANG, A. et al. Urinary tract infections. **Prim. Care.,** v. 40, p.687-706, 2013.

WANKE, C.A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a potential cause of diarrheal disease in adults infected with human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 1, p. 185-190, 1998.

WEI, J. et al. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. **Infect. Immun.** v. 71, p. 2775–2786, 2003.

WELCH, R. A. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. **Molec. Microbiol.**, v. 5, n. 3, p. 521-528, 1991.

WELCH, R. A. et al. The synthesis and function of the *Escherichia coli* hemolysin and related RTX exotoxins. **FEMS Microbiol. Immun.**, v. 5, n. 1-3, p. 29-36, 1992.

WHITTAM, T. S.; OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Geographic Components of Linkage Disequilibrium in Natural Populations of *Escherichia coli*. **Mol. Biol. Evol.,** v.1, p. 67-83, 1983.

WHO (WORLD HEATH ORGANIZATION) disponível em: <https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/> Acesso em: 09 ago. de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoeal disease**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>. Acesso em: 09 ago. de 2019.