

CLAUDIA ANDRADE FREIRE

**Papel da serinoprotease Sat na patogênese da
sepse causada por *Escherichia coli***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2021

CLAUDIA ANDRADE FREIRE

**Papel da serinoprotease Sat na patogênese da
sepse causada por *Escherichia coli***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Versão corrigida

São Paulo

2021

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)

Freire, Claudia Andrade

Papel da serinoprotease Sat na patogênese da
sepse causada por Escherichia coli / Claudia
Andrade Freire; orientador Dr. Waldir Pereira Elias
Junior. -- São Paulo, 2021.

178 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Escherichia coli. 2. Bacteremia. 3. Sepsis. 4.
Sat. 5. SPATEs. I. Elias Junior, Dr. Waldir
Pereira, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Claudia Andrade Freire

Título da Tese: Papel da serinoprotease Sat na patogênese da sepse causada por *Escherichia coli*

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

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:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Pesquisa de serino proteases autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATE) em Escherichia coli isolada de bacteremia humana*", registrado sob o protocolo nº **30/2016**, 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 **12/04/2016** 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 Junior**
- Departamento: *Microbiologia*
- Membros da Equipe: *Claudia Andrade Freire (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 http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/index.php?option=com_content&view=article&id=702. 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 "*Serine Proteases Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATE) in Escherichia coli isolated from human bacteremia*", protocol nº **30/2016**, 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 **4/12/2016** 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 Junior**
- Team members: *Claudia Andrade Freire (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
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb-c</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>4-8 semanas/weeks</i>	42

São Paulo, 18 de abril de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-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

Of.CEUA.030.2020

São Paulo, 26 de outubro de 2020.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado: "**Pesquisa de serino proteases autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATE) em *Escherichia coli* isolada de bacteremia humana**", registrado sob o protocolo nº 30/2016 e aprovado em 12/04/2016, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 12/05/2021**.

Autorizamos a prorrogação de vigência de licença, com a declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, exclusão dos animais originalmente aprovados e não utilizados (42 camundongos Balb/c), e inclusão dos seguintes animais:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Mus musculus</i>	Swiss	Fêmea / female	6-8 semanas / weeks	64

Local de procedência: Biotério Central do Instituto Butantan.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Prof.(a) Dr.(a) **Waldir Pereira Elias Junior**
Pesquisador do Instituto Butantan - São Paulo

Aos meus queridos paizinhos, José e Magnólia, que lutaram uma vida inteira para que eu sempre tivesse a melhor educação possível, sempre me dando amor, carinho e apoio ao longo dessa trajetória.

À minha irmã Eliane e minha sobrinha Laura, que sempre estiveram por perto me apoiando.

Ao meu amado Lucas, que sempre me apoiou e compreendeu todos os sacrifícios que esta jornada exigiu.

Ao meu querido Professor e amigo Waldir, que sempre acreditou em mim, especialmente nos momentos em que eu mesma não acreditei.

A Jesus e Nossa Senhora Aparecida, que caminharam comigo o tempo todo, me carregando no colo nos momentos mais difíceis. “Minha alma glorifica ao Senhor, meu espírito exulta de alegria em Deus, meu salvador!” (Lc 1, 46-47).

AGRADECIMENTOS

A Jesus e Nossa Senhora, pelo cuidado e providência ao longo de todos esses anos de doutorado. Por ouvirem às minhas preces, por permitirem que tantas coisas boas acontecessem na minha vida, sempre na hora de Deus, e por nunca me abandonarem nas dificuldades que vieram para me tornar mais forte.

Aos meus pais, José e Magnólia, por todo o apoio e por todo esforço que me permitiram estudar com conforto e perseguir o caminho profissional que realmente me faz feliz. Eu nunca teria este privilégio sem a luta de vocês. Espero conseguir retribuir todo esse esforço, pois tudo o que eu tenho veio de vocês. Amo muito vocês!

À minha irmã Eliane e minha sobrinha Laura, por todo amor, carinho e apoio. Amo muito vocês também, minhas meninas!

Ao meu amado Lucas, por tanto apoio e amor. Por entender cada sacrifício que esta jornada exigiu e sempre me incentivar a cada etapa. Te amo muito muito, meu panda!

Ao meu querido orientador, amigo e Professor, Dr. Waldir Pereira Elias Junior. Agradeço muito a Deus todos os dias por ter colocado você no meu caminho. Pedi muito a Ele que me ajudasse a encontrar um bom orientador e ganhei muito mais do que isso. Seu exemplo e sua amizade foram tão importantes nesses anos todos, perdi as contas de quantas vezes você foi como um pai para mim. Eu nunca conseguiria chegar tão longe sem o seu incentivo. Obrigada por me ensinar tanto, não só sobre Microbiologia, mas também sobre caráter e perseverança. Espero que no futuro, eu possa ser uma professora tão boa para os meus alunos, quanto você foi para mim.

À Prof.^a Dr.^a Rosa Maria Silva, por todos os ensinamentos ao longo desses anos e pela importantíssima colaboração neste trabalho. Trabalhar com você é incrível e não tem nada que eu goste mais do que te ouvir falar sobre ciência. Obrigada por abrir seu coração enorme para mim. Meu respeito por você é enorme e sou muito grata por todas as oportunidades que tive de conviver com você durante este tempo.

À Dr.^a Angela Silva Barbosa, pela importantíssima colaboração neste trabalho, por todos os ensinamentos ao longo desses anos e pelo seu exemplo de profissionalismo que sempre levarei comigo.

À Dr.^a Cecília Mari Abe, por todo companheirismo, carinho e amizade. Tudo fica sempre mais divertido quando você está por perto, seja no laboratório, nos “memes”, nos congressos. Obrigada pelo seu incentivo, por acreditar em mim e por me apoiar tanto, especialmente durante minha estadia em Birmingham. Carrego sua amizade e seu exemplo comigo para sempre!

Aos meus queridos amiguinhos do laboratório: Claudia Trigo, Fernanda Andrade, Paulo Schuroff, Jonatas Silva, Gabriel Correa, Alejandra Gúzman e Roberto Nepomuceno. Obrigada pelas risadas, pelo “bullying” diário (aqui incluo o Waldir e a Cecília também!), por toda ajuda (científica ou não!) e por todo companheirismo. É muito bom trabalhar com vocês e saber que nós somos uma família (aqui incluo o Waldir e a Cecília mais uma vez). Obrigada por tudo!

À Dr.^a Rita de Cássia Ruiz e ao assistente de pesquisa Paulo César Vieira, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, por ceder o soro anti-Sat utilizado nas imunodeteções.

A todos os funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, pelo apoio durante todos esses anos. Agradeço especialmente à Josi e à Dirce, pelo preparo dos meios, soluções e vidrarias. Vocês não têm ideia do quanto nos ajudam! Muito obrigada!

À Dr.^a Luciana Cezar de Cerqueira Leite pela disponibilização do biotério NB-2 do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan, para realização dos experimentos referentes ao modelo animal de sepse. Agradeço também à Dr.^a Dunia Del Carmen Rodriguez Soto e Dr.^a Monalisa Martins Trentini por todo suporte durante o uso do biotério.

À Médica veterinária Renata Gemio dos Reis e ao técnico Ricardo Alexandre de Souza Silva por toda ajuda durante os experimentos envolvendo o modelo animal de sepse.

Ao Dr. Daniel Carvalho Pimenta, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, pela realização da espectrometria de massas.

Ao Professor Ian R. Henderson e ao Dr. Jack A. Bryant, do *Institute of Microbiology and Infection*, da Universidade de Birmingham, por me receberem durante meu estágio de doutorado no exterior.

To my dearest BISH friends, specially Ioannis Lempesis and Maria Watroba, for making my life so much funnier during my staying in Birmingham and for being my family away from home. I miss you very much, my Bishes!

À Gisele Santana, secretária do programa de Pós-graduação em Microbiologia, e ao Prof. Dr. Carlos Peleschi Taborda, por todo empenho em me ajudar a receber a bolsa de doutorado sanduíche.

Aos meus queridos amigos, Luiz Romagnoli e Mariana Coelho, que sempre me incentivaram e entenderam realmente o que fazer um doutorado significa para mim. Vocês são incríveis. Amo muito vocês!

Ao Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos (*in memoriam*), pela primeira oportunidade que recebi no início da Pós-graduação. Agradeço também à Dr.^a Viviane Nakano por todo incentivo.

À todos os meu professores de Microbiologia, sejam do ensino técnico, da graduação ou do Serviço de Laboratório Clínico do HU-USP. Vocês me ajudaram a pavimentar o caminho para que eu entrasse no doutorado. Carrego seus ensinamentos e exemplos comigo sempre. Muito obrigada!

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processos nº 142053/2015-5 e nº 141887/2019-2) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2017/14821-7) no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Processo nº 88881.190211/2018-01) no *Institute of Microbiology and Infection, University of Birmingham* (Birmingham, Reino Unido).

O presente trabalho também foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001.

“A recompensa do jovem cientista é a emoção de ser a primeira pessoa na história do mundo a ver ou compreender algo. Nada pode se comparar com aquela experiência”.

Cecília Payne-Gaposchkin

“Se você sabe que está no caminho certo, se você tem esse conhecimento interior, ninguém pode desligá-lo ... não importa o que digam”.

Barbara McClintock

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada”.

Marie Curie

RESUMO

Freire, C.A. **Papel da serinoprotease Sat na patogênese da sepse causada por *Escherichia coli*. 2021.** 178 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

As *Escherichia coli* extraintestinais (ExPEC) fazem parte da microbiota intestinal humana, mas podem causar doença ao acessar um sítio extraintestinal. Este patógeno é um dos principais causadores das infecções de corrente sanguínea (ICS), uma vez que utiliza diversas estratégias para evasão dos mecanismos da imunidade inata encontrados no sangue, como o sistema complemento. Dentre elas, destacam-se dois membros da família das Serino Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs), denominadas Pic e EspP, cujas ações proteolíticas sobre o complemento já foram demonstradas. Porém, altas frequência do gene *sat* (que codifica a SPATE Sat) têm sido detectadas em cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia, fato que sugere o envolvimento desta SPATE na patogênese das ICS. Sat já foi caracterizada quanto à sua ação citotóxica sobre diferentes linhagens celulares, incluindo células endoteliais, mas sua possível ação imunomodulatória ainda não foi investigada. Diante dessas evidências, o presente trabalho se propôs a avaliar o papel de Sat na patogênese das ICS e da sepse causada por *E. coli*. Inicialmente, uma coleção de 278 cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia humana foi analisada quanto a presença de 12 genes que codificam SPATEs (*eatA*, *epeA*, *espC*, *espl*, *espP*, *pet*, *pic*, *sat*, *sepA*, *sigA*, *tsh* e *vat*). Dentre eles, *sat* foi o mais frequente, sendo detectado em 34,2% das cepas. Para continuidade do trabalho, a cepa EC071 foi selecionada desta coleção por não possuir outros genes que codificam SPATEs além de *sat*. Seu genoma foi sequenciado e a presença de outros genes relacionados à resistência ação bactericida do complemento, como genes de proteínas de membrana externa (*ompTc*, *ompTp* e *ompX*) e a protease Prc foram detectados. Ensaio de resistência à ação bactericida do soro humano normal mostraram que a cepa EC071 resiste a essa atividade. A protease Sat foi purificada em sua forma nativa a partir do sobrenadante de cultura da cepa EC071 e utilizada em ensaios proteolíticos contra as proteínas do sistema complemento. As proteínas C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9 foram clivados por Sat e essas clivagens foram inibidas por fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), um inibidor de serinoproteases. Um mutante em *sat* e mutantes complementados com o gene funcional ou não funcional foram obtidos a partir da EC071 e avaliados quanto a resistência à ação bactericida do soro. No entanto, não houve diferença significativa no fenótipo apresentado pelas construções em relação a cepa selvagem, indicando que Sat não é o único fator responsável por este fenótipo. Em um modelo murino de sepse, observou-se a redução de 50% nas mortes dos animais infectados pela cepa mutante em relação aos infectados pela cepa selvagem e a complementação de Sat funcional na cepa mutante restaurou parcialmente o efeito observado na cepa selvagem. Os resultados aqui apresentados mostram que Sat está envolvida no estabelecimento das ICS e da sepse e que, além de desempenhar efeitos citotóxicos, pode conferir também proteção contra o sistema imune do hospedeiro por meio da clivagem direta de proteínas do sistema complemento.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Bacteremia. Sepse. Sat. SPATEs.

ABSTRACT

Freire, C.A. **Role of the serineprotease Sat in the pathogenesis of sepsis caused by *Escherichia coli***. 178 f. Thesis (Ph.D. thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Extraintestinal *Escherichia coli* (ExPEC) are part of the human intestinal microbiota but can cause disease when accessing extraintestinal sites. This pathogen is one of the main causes of bloodstream infections (BSI) due to several strategies used to evade the mechanisms of innate immunity found in the blood, such as the complement system. Among them, two members of the Serine Proteases Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) family, named Pic and EspP, have been described presenting proteolytic effects against complement proteins. However, high frequencies of *sat*, which encodes the SPATE Sat, have been detected in strains of *E. coli* isolated from bacteremia, a fact that suggests the involvement of this SPATE in the pathogenesis of BSI. Sat has already been characterized for its cytotoxic action on different cell lines, including endothelial cells, but its possible immunomodulatory effects have not yet been investigated. Considering these evidences, the present study aimed to evaluate the role of Sat in the pathogenesis of BSI and sepsis caused by *E. coli*. Initially, a collection of 278 strains of *E. coli* isolated from human bacteremia was analyzed for the presence of 12 SPATEs-encoding genes. Among them, *sat* was the most frequent, detected in 34.2% of the strains. The strain EC071 was selected among that collection to continue the study due to the absence of other SPATEs-encoding genes that encode besides *sat*. Its whole genome was sequenced, and the presence of other genes related to resistance to the bactericidal action of the complement, such as genes coding outer membrane proteins (*ompTc*, *ompTp* e *ompX*) and the Prc protease were detected. Assays of resistance against the bactericidal action of normal human serum showed that the EC071 strain could resist to that activity. The protease Sat was purified in its native form from the culture supernatant of EC071 and used in proteolytic assays against proteins of the complement system. The proteins C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 and C9 were cleaved by Sat and these cleavages were inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor. A mutant in *sat* and mutants complemented with the functional or non-functional *sat* gene were obtained from EC071 and tested for resistance against the bactericidal action of the normal human serum. However, there was no significant difference in the phenotype presented by the constructions in comparison to the wild-type strain, indicating that Sat is not the unique factor responsible for this phenotype. In a murine sepsis model, a 50% reduction in deaths of the animals infected by the mutant strain was observed in relation to those infected by the wild-type strain and the complementation of functional *sat* in the mutant strain partially restored the effect observed in the wild strain. The results presented in this study show that Sat is involved in the establishment of BSI and sepsis and in addition to the cytotoxic effects, it can also provide protection against the immune system of the host by the direct cleavage of proteins of the complement system.

Key words: *Escherichia coli*. Bacteraemia. Sepsis. Sat. SPATEs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Patótipos reconhecidos de <i>E. coli</i>	210
Figura 2 – Vias de ativação do sistema complemento.	299
Figura 3 – Estrutura molecular das SPATEs.	355
Figura 4 – Secreção das SPATEs para o meio externo.	388
Figura 5 – Classificação das SPATEs.	399
Figura 6 – Patótipos de <i>E. coli</i> e <i>S. flexneri</i> relacionados à primeira descrição das SPATEs caracterizadas até o momento.....	411
Figura 7 – Frequência dos genes que codificam SPATEs nas cepas de <i>E. coli</i> isoladas de bacteremia analisadas.....	766
Figura 8 – DNA genômico extraído da cepa EC071.....	788
Figura 9 - Alinhamento entre as sequências preditas de aminoácidos dos genes <i>sat</i> da EC071 e CFT-073.	80
Figura 10 – Determinação do contexto genético de <i>sat</i> na cepa EC071 através da análise do perfil plasmideal da cepa.	866
Figura 11 - Resistência da cepa EC071 à ação bactericida do soro.	877
Figura 12 – Verificação da produção de Sat pela cepa EC071.	888
Figura 13 – Purificação de Sat a partir do sobrenadante de cultura da cepa EC071.	899
Figura 14 - Ensaio proteolítico simples.	900
Figura 15 - Ensaio proteolítico com diferentes quantidades de Sat e inibição por PMSF.	944
Figura 16 – Obtenção da construção pCF1.....	100
Figura 17 – Digestões enzimáticas de pCF1 e pJP5603.....	1011
Figura 18 – Obtenção da construção pCF2.....	1022
Figura 19 – Confirmação da inserção da construção pCF2 no gene <i>sat</i> da cepa EC071.	1033
Figura 20 – Obtenção da construção pCF3.....	1044
Figura 21 – Obtenção da construção pCF4.....	1055
Figura 22 - Verificação da produção ou ausência da produção de Sat ou Sat' na cepa EC071 e construções genéticas derivadas.	1066
Figura 23 – Verificação da produção ou ausência da produção de Sat ou Sat' nas cepas DH5 α , MG1655 e construções genéticas derivadas.....	1077
Figura 24 – Curva de Crescimento e média da relação D.O. 600nm da cepa EC071 e cepas derivadas.	1088
Figura 25 – Curva de Crescimento e média da relação D.O. 600nm das cepas CFT073.	1099

Figura 26 – Curva de crescimento e média da relação D.O. 600nm da cepa MG1655 e cepas derivadas.	110
Figura 27 – Resistência das cepas EC071 e cepas derivadas à ação bactericida do soro humano.	1111
Figura 28 – Sobrevivência dos camundongos inoculados com a cepa EC071 e suas cepas derivadas no modelo murino de sepse.	1133
Figura 29 – Contagem de UFC/g órgão dos camundongos inoculados com a cepa EC071 e suas cepas derivadas no modelo murino de sepse.	1144
Figura 30 – Possíveis pontos de bloqueio da ativação do sistema complemento pela ação proteolítica de Sat, com base nos resultados obtidos no presente estudo. ...	1233
Figura 31 – Modelo hipotético do papel de Sat na patogênese da sepse causada por <i>E. coli</i> , considerando os dados experimentais existentes na literatura e obtidos no presente estudo.	1299

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais mecanismos de resistência ao soro utilizados por <i>E. coli</i>	34
Tabela 2 – Iniciadores específicos utilizados na pesquisa de genes que codificam SPATEs.....	48
Tabela 3 – Soluções utilizadas na análise do perfil plasmideal.	52
Tabela 4 - Preparo dos tubos para teste de resistência à ação bactericida do soro.	54
Tabela 5 - Tampões utilizados na cromatografia em coluna de troca iônica.....	59
Tabela 6 - Cepas utilizadas nas construções genéticas.	62
Tabela 7 - Vetores utilizados nas construções genéticas.	63
Tabela 8 - Iniciadores utilizados para a obtenção das construções genéticas.	64
Tabela 9 - Cepas testadas no modelo murino de sepse.....	74
Tabela 10 – Perfil genético das cepas analisadas quanto a presença de genes que codificam SPATES.	77
Tabela 11 - Parâmetros de qualidade do sequenciamento completo do genoma da EC071.	79
Tabela 12 – Pesquisa de genes que codificam SPATEs no genoma da cepa EC071 através da plataforma BLAST.	81
Tabela 13 – Pesquisa de genes relacionados à virulência intrínseca das ExPEC no genoma da cepa EC071 através da plataforma Blast.	82
Tabela 14 – Fatores de virulência relacionados a mecanismos de resistência ao soro pesquisados no genoma da cepa EC071, utilizando as sequências de referência do banco ecoli VF collection e com o auxílio da plataforma Blast.	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1 <i>Escherichia coli</i>.....	20
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal	22
1.2 <i>Bacteremia e infecções da corrente sanguínea</i>	25
1.3 <i>Sepse e choque séptico</i>	26
1.4 <i>Reconhecimento de patógenos pelo sistema imune e patogênese da seps</i>.....	27
1.4.1 <i>Sistema complemento</i>	28
1.5 <i>Mecanismos de resistência à ação bactericida do soro</i>.....	32
1.6 <i>Serinoproteases autotransportadoras da família Enterobacteriaceae</i>..	35
1.6.1 <i>Características moleculares</i>	35
1.6.2 <i>Secreção para o meio externo</i>	36
1.6.3 <i>Classificação das SPATEs</i>	38
1.6.4 <i>Frequência das SPATEs entre os patótipos de E. coli</i>	40
1.6.5 <i>Secreted autotransporter toxin (Sat)</i>	42
2. OBJETIVO.....	45
2.1 <i>Objetivos específicos</i>	45
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 <i>Pesquisa do gene sat e de outros genes que codificam SPATEs em cepas de E. coli isoladas de bacteremia humana</i>	46
3.1.1 <i>Características das cepas analisadas</i>	46
3.1.2 <i>Reativação das cepas e obtenção de DNA</i>	46
3.1.3 <i>Pesquisa de genes que codificam SPATEs</i>	47
3.2 <i>Caracterização da cepa EC071</i>	49
3.2.1 <i>Sequenciamento completo do genoma da EC071</i>	50
3.2.1.1 <i>Extração de DNA genômico</i>	50
3.2.1.2 <i>Sequenciamento na plataforma Illumina e processamento dos dados</i>	50
3.2.1.3 <i>Análise do genoma completo da cepa protótipo</i>	50
3.2.2 <i>Determinação do contexto genético de sat na EC071</i>	51
3.2.2.1 <i>Análise do perfil plasmideal da EC071</i>	51
3.2.2.2 <i>Southern blot</i>	53
3.2.2.3 <i>Obtenção da sonda e hibridização</i>	53
3.2.3 <i>Resistência à ação bactericida do soro humano da cepa EC071</i>	54
3.2.4 <i>Verificação da produção de Sat pela cepa EC071</i>	55
3.2.4.1 <i>Precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura com ácido tricloroacético</i>	55
3.2.4.2 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	56
3.2.4.3 <i>Coloração por nitrato de prata</i>	56
3.2.4.4 <i>Imunodeteção de Sat</i>	57
3.3 <i>Purificação de Sat a partir do sobrenadante de cultura da EC071</i>	58

3.3.1	<i>Concentração do sobrenadante de cultura da EC071</i>	58
3.3.2	<i>Cromatografia em coluna de afinidade (troca iônica)</i>	58
3.3.3	<i>Análise das frações obtidas na troca iônica</i>	59
3.3.4	<i>Confirmação da identidade de Sat</i>	59
3.3.5	<i>Quantificação de Sat purificada nas frações</i>	60
3.4	<i>Ensaio de clivagem das moléculas do complemento por Sat purificada</i> 60	
3.4.1	<i>Ensaio proteolítico simples</i>	60
3.4.2	<i>Ensaio proteolítico com inibição por PMSF</i>	61
3.5	<i>Construções genéticas</i>	61
3.5.1	<i>Indução de competência e quimiotransformação</i>	61
3.5.2	<i>Vetores e cepas utilizadas</i>	62
3.5.3	<i>Iniciadores utilizados e condições de PCR</i>	63
3.5.4	<i>Extrações plasmidiais e purificações de DNA</i>	65
3.5.5	<i>Quantificação de DNA e sequenciamentos</i>	65
3.5.6	<i>Mutagênese do gene sat na EC071</i>	65
3.5.6.1	<i>Clonagem do fragmento interno homólogo ao gene sat em pGEM-T easy</i> .	66
3.5.6.2	<i>Subclonagem do fragmento homólogo à sat em pJP5603</i>	66
3.5.6.3	<i>Conjugação</i>	67
3.5.6.4	<i>Confirmação da inserção do pCF2 no gene sat EC071 e ausência da produção de Sat</i>	67
3.5.7	<i>Construção do clone mínimo de expressão de Sat</i>	68
3.5.7.1	<i>Seleção do vetor e desenho de iniciadores com sítios de restrição</i>	68
3.5.7.2	<i>Amplificação e digestão do inserto e do vetor</i>	68
3.5.7.3	<i>Ligação e transformação</i>	69
3.5.7.4	<i>Confirmação da clonagem do gene sat no vetor pettac</i>	69
3.5.7.5	<i>Verificação da produção de Sat pelo clone mínimo de expressão</i>	69
3.5.8	<i>Mutagênese sítio dirigida no clone mínimo de Sat</i>	69
3.5.8.1	<i>Desenho de iniciadores para mutação sítio-dirigida</i>	70
3.5.8.2	<i>Amplificação para fixação das mutações e tratamento dos produtos com a enzima DpnI</i>	70
3.5.8.3	<i>Transformação dos produtos de amplificação</i>	70
3.5.8.4	<i>Confirmação da mutação sítio dirigida no gene sat</i>	71
3.5.8.5	<i>Verificação da produção de Sat' pelo mutante sítio dirigido</i>	71
3.5.9	<i>Complementação do mutante EC071::pCF2</i>	71
3.5.9.1	<i>Transformação de pCF3 e pCF4</i>	71
3.5.9.2	<i>Confirmação da complementação de EC071::pCF2</i>	71
3.5.9.3	<i>Confirmação da expressão de Sat e Sat' pelas cepas complementadas</i>	72
3.5.10	<i>Transformação das construções pCF3 e pCF4 na cepa MG1655</i>	72
3.6	<i>Curva de crescimento das cepas CFT073, EC071, MG1655 e respectivas cepas derivadas</i>	72
3.7	<i>Resistência das cepas derivadas da cepa EC071 à ação bactericida do soro humano</i>	73
3.8	<i>Modelo animal de sepse</i>	73
3.8.1	<i>Cepas testadas e preparo dos inóculos</i>	73

3.8.2	<i>Descrição do modelo</i>	74
4.	RESULTADOS	76
4.1	<i>Pesquisa do gene sat e de outros genes que codificam SPATEs em cepas de E. coli isoladas de bacteremia humana</i>	76
4.2	<i>Caracterização da cepa EC071</i>	78
4.2.1	<i>Sequenciamento completo no genoma da cepa EC071</i>	78
4.2.2	<i>Determinação do contexto genético de sat na EC071</i>	85
4.2.3	<i>Resistência da cepa EC071 à ação bactericida do soro humano</i>	87
4.2.4	<i>Verificação da produção de Sat pela EC071</i>	88
4.3	<i>Purificação de Sat a partir do sobrenadante de cultura da EC071</i>	89
4.4	<i>Ensaio de clivagem das proteínas do complemento por Sat purificada</i> 90	
4.4.1	<i>Ensaio proteolítico simples</i>	90
4.4.2	<i>Ensaio proteolítico com inibição</i>	94
4.5	<i>Construções genéticas obtidas</i>	99
4.5.1	<i>Obtenção da cepa mutante em sat EC071::pCF2</i>	99
4.5.2	<i>Obtenção das construções pCF3 e pCF4</i>	103
4.5.3	<i>Imunodeteção de Sat ou Sat' pelas construções genéticas obtidas</i> ..	106
4.6	<i>Curva de crescimento das cepas CFT073, EC071, MG1655 e respectivas cepas derivadas</i>	107
4.7	<i>Resistência das cepas derivadas da cepa EC071 à ação bactericida do soro humano</i>	111
4.8	<i>Modelo murino de sepse</i>	112
5.	DISCUSSÃO	116
6.	CONCLUSÕES	131
7.	REFERÊNCIAS	132
ANEXOS	147
Anexo A	148
Anexo B	149
Anexo C	151
Anexo D	174
Anexo E	176
Anexo F	177

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa primeiramente descrita em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich, que a isolou das fezes de uma criança com diarreia (ESCHERICH, 1988). Trata-se de um membro da família Enterobacteriaceae que constitui uma parte significativa da microbiota do intestino grosso de humanos e animais de sangue quente, sendo que a maioria das cepas vivem de forma comensal no cólon e raramente causam doença em indivíduos sadios (GOMES et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

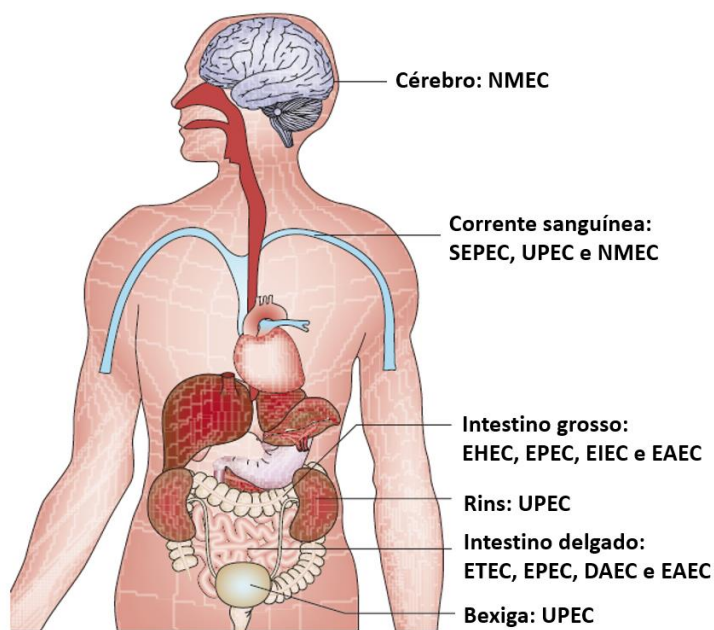
A estrutura genômica de *E. coli* é dividida em duas grandes partes. A primeira representa uma parte comum a todas as cepas, denominada *core genome*, e contém genes conservados necessários para as funções celulares, também chamados de *housekeeping genes* (DOBRINDT, 2005; PITOUT, 2012). A análise de alguns desses genes permite a classificação filogenética das cepas de *E. coli* em oito diferentes grupos (A, B1, B2, C, D, E, F e G), que representam diferentes subestruturas genéticas relacionadas a aspectos como o habitat e manutenção do DNA proveniente de outras cepas (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; CLERMONT et al., 2013, 2019). A segunda parte do genoma de *E. coli* compreende um conjunto flexível de genes que não é comum para todas as cepas e que fornece propriedades adicionais para aquelas que as possuem. A constituição dessa porção é moldada por eventos de transferência genética horizontal (*horizontal genetic transfer*, HGT), através da aquisição de elementos genéticos móveis que podem se integrar ao cromossomo ou se replicar independentemente, como ilhas de patogenicidade, bacteriófagos e plasmídeos (DOBRINDT, 2005; PITOUT, 2012).

A aquisição de genes que codificam fatores de virulência através desses eventos resultou no estabelecimento de clones altamente especializados, com grande habilidade de colonização de novos sítios e, conseqüentemente, capazes de causar doença em hospedeiros imunocompetentes (BIELASZEWSKA et al., 2007; CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Dessa forma, a diversidade e versatilidade apresentadas pelas cepas de *E. coli* permitem que sejam divididas em três grandes grupos: comensais não patogênicas, patogênicas intestinais e

patogênicas extraintestinais (DOBRINDT, 2005; JOHNSON; RUSSO, 2002; RUSSO; JOHNSON, 2000).

Geralmente, as *E. coli* comensais não patogênicas não possuem os determinantes de virulência encontrados nas cepas patogênicas, apesar de serem capazes de causar doença em indivíduos imunocomprometidos ou acometidos por alguma doença de base (JOHNSON; RUSSO, 2002; PICARD et al., 1999; RUSSO; JOHNSON, 2000; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). Já as *E. coli* patogênicas são classificadas em diferentes patótipos (Figura 1), que representam um grupo específico de clones que compartilham fatores de virulência e certas características fenotípicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; JOHNSON; RUSSO, 2018). No entanto, certos isolados combinam importantes características de virulência de diferentes patótipos e são considerados cepas híbridas potencialmente virulentas (GOMES et al., 2016; SANTOS et al., 2020).

Figura 1 – Patótipos reconhecidos de *E. coli*.



Fonte: Adaptado de Croxen e Finlay (2010).

NMEC: *E. coli* causadora de meningite neonatal; SEPEC: *E. coli* associada à sepse; UPEC: *E. coli* uropatogênica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EIEC: *E. coli* enteroinvasora; EAEC: *E. coli* enteroagregativa; ETEC: *E. coli* enterotoxigênica; DAEC: *E. coli* que adere difusamente.

As *E. coli* patogênicas intestinais, também conhecidas como diarreio gênicas (DEC), são classificadas em seis patótipos, de acordo com os mecanismos de virulência empregados e sintomas clínicos provocados, sendo alguns deles considerados importantes problemas de saúde pública em alguns países (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016). São eles: *E. coli* enteropatogênica (*enteropathogenic E. coli*, EPEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (*Shiga toxin-producing E. coli*, STEC) , que inclui o grupo das *E. coli* enterohemorrágicas (*enterohemorrhagic E. coli*, EHEC), *E. coli* enteroagregativa (*enteroaggregative E. coli*, EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (*enterotoxigenic E. coli*, ETEC), *E. coli* enteroinvasora (*enteroinvasive E. coli*, EIEC) e *E. coli* que adere difusamente (*diffusely-adherent E. coli*, DAEC) (CROXEN; FINLAY, 2010; CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As cepas de *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) colonizam o trato intestinal de humanos de forma assintomática. No entanto, possuem uma grande diversidade de fatores de virulência que permitem causar doença ao acessarem sítios extraintestinais em indivíduos imunocompetentes (JOHNSON; RUSSO, 2018; RUSSO; JOHNSON, 2000; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; VILA et al., 2016). Suas características moleculares e clínicas, bem como sua classificação serão tratadas a seguir.

1.1.1 *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

O termo ExPEC foi proposto por Russo e Johnson (2000) para designar cepas filogeneticamente distintas das *E. coli* comensais não patogênicas e das DEC, com baixo ou nenhum potencial patogênico intestinal, porém capazes de colonizar o trato gastrointestinal efetivamente. A sua simples presença não implica no desenvolvimento de doença, uma vez que para isso precisam acessar, persistir e se adaptar a um sítio extraintestinal (JOHNSON; RUSSO, 2002; KÖHLER; DOBRINDT, 2011; MANGES et al., 2019; RUSSO; JOHNSON, 2000). O intestino humano é um importante reservatório de ExPEC, uma vez que essas cepas fazem parte da microbiota de indivíduos saudáveis (DALE; WOODFORD, 2015; ERJAVEC; ŽGUR-BERTOK, 2015; KÖHLER; DOBRINDT, 2011), mas outras fontes como animais de companhia, alimentos, água parada, esgotos e efluentes também desempenham um importante

papel na sua disseminação (BÉLANGER et al., 2011; JANG et al., 2017; MANGES; JOHNSON, 2015; WASIŃSKI, 2019).

A virulência de ExPEC depende da sua habilidade de sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, especialmente no soro (BIRAN; RON, 2018). Sua patogenicidade tem sido relacionada com diversos fatores de virulência, geralmente codificados por genes presentes em ilhas de patogenicidade ou plasmídeos e pertencentes a cinco principais grupos: adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro, protectinas e invasinas (JOHNSON; RUSSO, 2018; PITOUT, 2012; RODRÍGUEZ-BELTRÁN et al., 2015; TENAILLON et al., 2010). No entanto, tem-se observado que a patogenicidade sítio-específica não é dependente de um único fator de virulência, mas sim de uma combinação de fatores com expressão coordenada e, ainda, de aspectos relacionados ao hospedeiro (DALE; WOODFORD, 2015). A variação dessas combinações resulta na diversidade de mecanismos de virulência utilizados por ExPEC, aumentando a sua versatilidade e potencial patogênico (VILA et al., 2016).

Dentre os patótipos reconhecidos de ExPEC destacam-se a *E. coli* uropatogênica (*uropathogenic E. coli*, UPEC), *E. coli* associada a sepse (*septicemic E. coli*, SEPEC) e *E. coli* associada a meningite neonatal (*neonatal-meningitis associated E. coli*, NMEC) (Figura 1) (BIRAN; RON, 2018; KÖHLER; DOBRINDT, 2011; LEIMBACH; HACKER; DOBRINDT, 2013). O critério utilizado para essa classificação se baseia no sítio de isolamento da cepa e o contexto clínico da infecção e, apesar de conveniente na maioria dos casos, é falho por diversos motivos. Primeiramente, algumas cepas também são capazes de causar infecção em sítios extraintestinais diferentes daquele onde foi primeiramente isolada. Em segundo lugar, cepas pouco ou não virulentas podem causar infecção em sítios extraintestinais em indivíduos imunocomprometidos, evidenciando a importância do estado do hospedeiro no desenvolvimento da infecção. Finalmente, apesar da patogênese de algumas dessas infecções ser relacionada com a presença de fatores de virulência específicos, como as fímbrias do tipo 1 e P no caso das ITU e a cápsula do grupo 2 no caso da meningite, sabe-se que esses fatores de virulência não estão restritos a cepas isoladas desses sítios (DALE; WOODFORD, 2015; VILA et al., 2016). Ainda, o patótipo *E. coli* patogênica aviária (*avian pathogenic E. coli*, APEC) também é reconhecido como responsável pela ocorrência de colibacilose septicêmica em aves utilizando mecanismos de virulência bem delineados. No entanto, algumas de suas cepas são geneticamente muito próximas das ExPEC isoladas de humanos e são

relacionadas à ocorrência de infecções extraintestinais de origem alimentar neste hospedeiro (KÖHLER; DOBRINDT, 2011; MANGES; JOHNSON, 2015; MARKLAND et al., 2015; MELLATA; JOHNSON; CURTISS, 2017; SAROWSKA et al., 2019).

Outra forma de classificação das ExPEC é baseada na determinação do potencial patogênico extraintestinal de uma cepa, por meio da análise de sua virulência intrínseca (DALE; WOODFORD, 2015; VILA et al., 2016). Estudos envolvendo a caracterização genética dos fatores de virulência e a observação da virulência extraintestinal em modelos animais de diferentes coleções de *E. coli*, isoladas das fezes ou de sítios extraintestinais de humanos, permitiram que Johnson et al. (2003) propusessem a utilização de cinco diferentes genes como indicadores independentes da virulência intrínseca de uma cepa: *papA* e/ou *papC* (operon que codifica a fimbria P), *sfa/foc* (operon que codifica a fimbria S), *afa/dra* (operon que codifica adesinas da família Dr), *iutA* (gene que codifica o receptor de aerobactina) e *kpsMTII* (operon que codifica a cápsula do grupo 2). Dessa forma, a presença de dois ou mais desses genes indica que a cepa é capaz de causar doença extraintestinal em um indivíduo imunocompetente, sendo denominada ExPEC ou ExPEC⁺. Conseqüentemente, cepas que não atendem a este critério são denominadas não-ExPEC ou ExPEC⁻ (JOHNSON et al., 2003).

Em relação à classificação filogenética, as cepas de ExPEC pertencem principalmente aos filogrupos B2 e D, conhecidos por reunir cepas bastante virulentas (JOHNSON; RUSSO, 2002; LEIMBACH; HACKER; DOBRINDT, 2013; PICARD et al., 1999; PITOUT, 2012). No entanto, essas divisões não são absolutas e isolados não pertencentes aos filogrupos B2 ou D já foram associados à ocorrência de doença extraintestinal (DALE; WOODFORD, 2015). Sua plasticidade genômica permitiu a emergência de linhagens hipervirulentas e, muitas vezes, multirresistentes aos antibióticos, fazendo com que as ExPEC sejam cada vez mais reconhecidas como importantes patógenos associados a diferentes infecções extraintestinais (DALE; WOODFORD, 2015; MANGES; JOHNSON, 2015).

O impacto clínico e econômico das infecções provocadas por ExPEC é significativo, uma vez que necessitam de acompanhamento médico e muitas vezes resultam na perda de produtividade e morbidade prolongada do indivíduo acometido (MANGES et al., 2019; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). Essas infecções podem ser tanto de origem nosocomial como adquiridas na comunidade e dentre elas, destacam-se as infecções do trato urinário (ITU), infecções abdominais e pélvicas,

pneumonia, meningite e infecções da corrente sanguínea (ICS) (RUSSO; JOHNSON, 2003).

As ICS causadas por ExPEC podem ser primárias, tanto pela translocação bacteriana a partir do intestino como através de dispositivos médicos intravasculares, ou secundárias a outras infecções extraintestinais, especialmente as ITU (MELLATA et al., 2016; RUSSO; JOHNSON, 2003; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; VILA et al., 2016). A presença de *E. coli* na corrente sanguínea pode provocar a indução de uma forte resposta inflamatória do hospedeiro e levar ao desenvolvimento de sepse, quadro fortemente associado a altas taxas de mortalidade e morbidade (MIAJLOVIC; SMITH, 2014; RUSSO; JOHNSON, 2003).

1.2 Bacteremia e infecções da corrente sanguínea

A presença de bactérias na corrente sanguínea é denominada bacteremia. Este quadro pode resultar tanto de atividades rotineiras, como escovar os dentes e a realização de pequenos procedimentos médicos, como de outras infecções já estabelecidas no hospedeiro, geralmente de origem intra-abdominal, nos tratos respiratório e urinário ou ainda, por dispositivos médicos como cateteres e sondas. O acesso da bactéria ao sangue pode levar a dois diferentes resultados: a bacteremia pode ser transiente e clinicamente benigna, com a eliminação bem sucedida do patógeno pelo sistema imune do hospedeiro, ou evoluir para uma infecção de corrente sanguínea, devido a falha ou subversão pela bactéria desses mecanismos imunes e/ou na presença de alterações anatômicas que facilitam a constante entrada da bactéria no sangue (CHRISTAKI; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2014).

A ICS é decorrente da presença de bactérias (ou outros microrganismos) viáveis no sangue que iniciam uma resposta inflamatória caracterizada por alterações clínicas, laboratoriais e hemodinâmicas no hospedeiro (VISCOLI, 2016). O padrão ouro para o diagnóstico da ICS é a realização da hemocultura, cujo resultado positivo deve ser criteriosamente interpretado em virtude de possíveis contaminações oriundas da falha dos procedimentos de assepsia durante a coleta das amostras (LAUPLAND; CHURCH, 2014; SINHA et al., 2018). É importante ressaltar que o isolamento de *E. coli* de hemoculturas é sempre clinicamente significativo, especialmente na presença de outras infecções extraintestinais previamente diagnosticadas (RUSSO; JOHNSON, 2003; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

O estabelecimento e evolução da ICS dependem de fatores como o agente infeccioso envolvido e sua virulência, frequência de invasão da corrente sanguínea (contínua ou intermitente), recursos diagnósticos disponíveis, resposta do hospedeiro à infecção e início do tratamento adequado e em tempo hábil (VENDEMIATO et al., 2015). Os gêneros mais frequentemente isolados são *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter baumannii*, dentre as bactérias Gram negativas, e *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase negativa e *Enterococcus faecalis*, dentre as Gram positivas (BHARADWAJ et al., 2014). No Brasil, alguns estudos relatam uma alternância entre Gram negativos e Gram positivos como principais agentes causadores dessas infecções, sendo *E. coli* um dos Gram negativos mais frequentemente isolados (CARLESSE et al., 2016; MENEZES et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; VENDEMIATO et al., 2015; SABINO et al., 2019).

É importante salientar que os termos ICS e bacteremia são erroneamente utilizados como sinônimos. Enquanto o primeiro é mais abrangente, uma vez que a ICS pode ser causada por diferentes microrganismos e implica na obtenção de uma hemocultura positiva associada aos sintomas clínicos de infecção, a bacteremia pode ocorrer de forma transiente sem associação com uma infecção estabelecida (LAUPLAND; CHURCH, 2014).

Ao acessar o sangue, a bactéria encontra o sistema imune inato do hospedeiro e, na maioria das vezes, a eliminação do patógeno ocorre de maneira eficiente por meio de várias reações pró-inflamatórias que ocorrem de forma protetora e balanceada. No entanto, o patógeno pode prevalecer e continuar se multiplicando, fazendo com que a resposta do hospedeiro se torne descompensada e danosa. A falha na eliminação do patógeno causador da ICS pode provocar a evolução do quadro para a sepse (VAN DER POLL et al., 2017), que se diferencia da infecção devido a resposta desregulada ou exacerbada do hospedeiro e pela presença de disfunção orgânica (SINGER et al., 2016).

1.3 Sepse e choque séptico

A sepse é definida como uma disfunção orgânica causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. Trata-se de uma resposta multifatorial do hospedeiro à um patógeno, que pode ser influenciada por fatores endógenos, como a presença de doenças pré-existentes e comorbidades, a

administração de determinados medicamentos e outras intervenções. A complicação da sepse é denominada de choque séptico, onde passam a ocorrer alterações circulatórias, celulares e metabólicas graves suficientes para aumentar substancialmente o risco de morte (SINGER et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO) colocou a sepse como prioridade global no ano de 2017 e divulgou uma série de diretrizes para melhora de sua prevenção, do seu diagnóstico e gerenciamento (WHO, 2017). Em seu relatório nacional do “Programa de Melhoria de Qualidade – Protocolos Gerenciados de Sepse” referente ao ano de 2019, o Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS) reporta a ocorrência de 12.340 casos de sepse e 3.231 casos de choque séptico nos 84 hospitais brasileiros incluídos no programa, com uma taxa de letalidade de 20,4% e 56,7% respectivamente. No entanto, esses dados não refletem a realidade de todos os serviços de saúde do país, uma vez que levam em consideração apenas os hospitais participantes do programa, que adotam medidas para a diminuição desses casos (ILAS, 2019). Dados mais abrangente foram obtidos em um estudo multicêntrico realizado por Machado et al. (2017) em unidades de terapia intensiva (UTI) brasileiras, onde estimou-se a ocorrência anual de aproximadamente 420.000 casos de sepse, com uma taxa de mortalidade de 55,7%.

A sepse e o choque séptico devem ser tratados como emergência médica. Sinais clínicos e parâmetros laboratoriais dos pacientes com suspeita de um desses quadros devem ser rapidamente avaliados, para que um tratamento adequado seja iniciado em tempo hábil (CECCONI et al., 2018).

1.4 Reconhecimento de patógenos pelo sistema imune e patogênese da sepse

A patogênese da sepse é complexa e envolve múltiplos aspectos da interação entre o patógeno e o hospedeiro. O reconhecimento de patógenos e a resultante ativação celular são fundamentais para o controle da infecção, no entanto a resposta inflamatória do hospedeiro também é substrato para a mudança fisiopatológica ocorrida na sepse (SALOMÃO et al., 2019).

A resposta do hospedeiro a um patógeno invasor é iniciada por uma série de reações do sistema imune inato, que se iniciam por meio do reconhecimento de estruturas moleculares conservadas presentes na superfície do invasor, denominadas

padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Células do sistema imune inato, como as células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, reconhecem esses PAMPs por meio de seus receptores reconhecedores de padrão (*pattern recognition receptors*, PRRs) expressos na sua superfície ou no seu citoplasma. A interação entre PAMPs e PRRs leva à produção de citocinas pró inflamatórias e quimiocinas, que promovem o recrutamento de fagócitos e ativação local dos sistemas complemento e de coagulação. Normalmente, o desencadeamento dessas reações inflamatórias leva à eliminação do patógeno e mecanismos compensatórios que diminuem a inflamação permitem o retorno a homeostase (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; VAN DER POLL et al., 2017).

No entanto, quando o patógeno subverte esses mecanismos da imunidade inata e continua se multiplicando, mesmo com a resposta imune em andamento, esta acaba ficando desregulada e começa a ser danosa ao hospedeiro. A partir daí, ocorrem simultaneamente inflamação excessiva e supressão imune desreguladas, características da sepse. Destaca-se a liberação de padrões moleculares associados ao dano (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) decorrentes do dano celular provocado pela inflamação excessiva, que são reconhecidos pelos PRRs e estimulam a ativação da resposta imune da mesma forma que os PAMPs, agravando assim a resposta inflamatória. A supressão imune é uma tentativa de regulação da resposta inflamatória excessiva, por meio de mecanismos como a apoptose de células dendríticas, linfócitos T e B, reprogramação de células apresentadoras de antígenos e outros (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; VAN DER POLL et al., 2017).

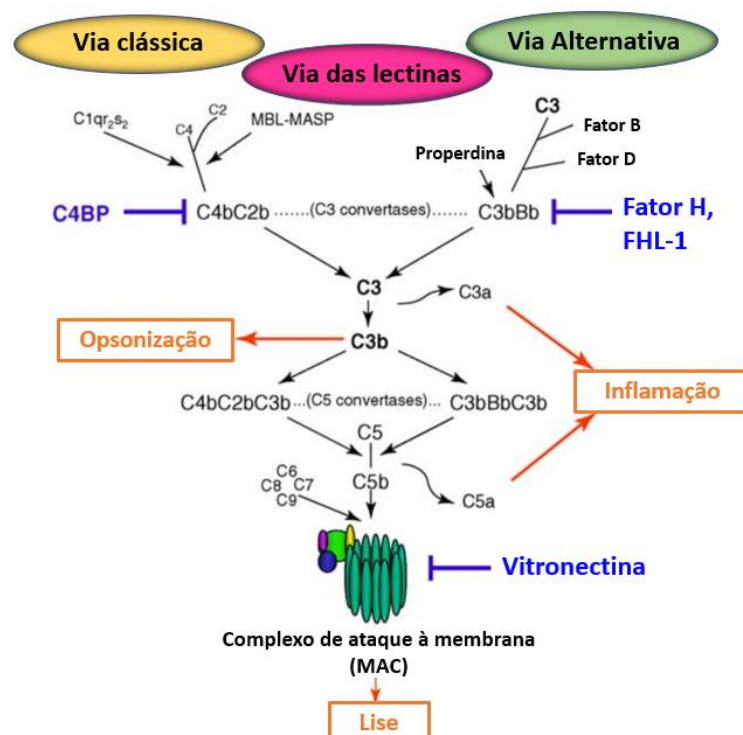
1.4.1 Sistema complemento

O sistema complemento faz parte do sistema imune inato e uma de suas principais funções é a eliminação de patógenos, além de ser responsável por evitar a destruição autóloga por meio da remoção de complexos imunes e eliminar células apoptóticas e tumorais. Ainda, contribui para a imunidade adaptativa, aumentando a produção de anticorpos, memória imunológica e a resposta de células T (LÓPEZ-LERA et al., 2019; MACEDO; ISAAC, 2016).

Ele é composto por uma série de proteínas expressas em superfícies celulares ou presentes no plasma, sendo estas últimas produzidas principalmente pelo fígado. O complemento atua na circulação e nos tecidos, e sua ativação é minuciosamente controlada para evitar o consumo excessivo dessas proteínas plasmáticas e dano tecidual. Ainda, as proteínas do complemento também podem atuar como receptores de superfície celular e mediar importantes interações com as células do sistema imune. De forma geral, a ativação do sistema complemento durante uma infecção leva à inflamação, opsonização, fagocitose e destruição do patógeno. Se necessário, também promove a ativação da resposta imune adaptativa (LUBBERS et al., 2017; MACEDO; ISAAC, 2016; MERLE et al., 2015^a).

Sua ativação pode ocorrer por três diferentes vias: clássica, alternativa e das lectinas (Figura 2). Patógenos podem ativar o complemento por qualquer uma das três vias, sendo que a(s) via(s) utilizada(s) será determinada pela composição do envoltório celular do invasor (MERLE et al., 2015b). As vias clássica e das lectinas utilizam moléculas “sensoras” para o reconhecimento de padrões distintos presentes nas superfícies celulares, enquanto a via alternativa se inicia pela clivagem espontânea de C3 (revisado em MERI, 2016).

Figura 2 – Vias de ativação do sistema complemento.



Fonte: Adaptado de Hallström e Riesbeck (2010).

A molécula de reconhecimento e ativação da via clássica é C1q, que reconhece complexos imunes compostos por IgM ou IgG. Apesar de também ser conhecida como via anticorpo-dependente, C1q também pode ativar a via clássica por meio do reconhecimento direto de estruturas presentes no patógeno invasor (como lipopolissacarídeos, ácidos teicóicos e porinas) ou ainda, com o auxílio de moléculas de reconhecimento endógenas, como as pentatraxinas. O complexo C1q_{r2s2} é formado pelas serinoproteases C1r e C1s, que são ativadas após a ligação de C1q à porção Fc de anticorpos ligados à superfície do patógeno. C1s cliva C4 em C4a e C4b, levando a deposição de C4b nas superfícies vizinhas ao sítio de ativação, promovendo a opsonização do patógeno. Por meio da clivagem de C2 ligado a C4b pela protease C1s, forma-se a C3 convertase da via clássica denominada C4b2a, que promove a clivagem de C3 em C3a e C3b. Enquanto C3a está envolvida em processos pró-inflamatórios, C3b participa de processos como a opsonização e da formação das C5 convertases das três vias de ativação do sistema complemento, responsáveis pela clivagem de C5 em C5a e C5b (LUBBERS et al., 2017; MERI, 2016; RICKLIN et al., 2010). A ativação da via clássica é regulada por uma molécula serpina denominada inibidor de C1, que se liga à C1r e C1s e inativa essas proteases, promovendo a dissociação do C1q_{r2s2} e a liberação da molécula de C1q (MERLE et al., 2015a).

No caso da via das lectinas, lectinas ligadoras de manose (*manose-binding lectins*, MBL) e ficolinas atuam como moléculas de reconhecimento e ativação e estão associadas a serinoproteases (*MBL-associated serineproteases*, MASPs) semelhantes a C1r e C1s. A partir do reconhecimento de carboidratos contendo manose ou N-acetil-glucosamina presentes na superfície do patógeno, MASP-1 ativa MASP-2, que cliva C4 e C2, formando a mesma C3 convertase da via clássica (LUBBERS et al., 2017; MERI, 2016; RICKLIN et al., 2010). A regulação da iniciação da via das lectinas é influenciada por MASP-3 e pelas proteínas *MBL-associated proteins of 44 and 19 kDa* (Map-44 e Map19), que possuem homologia com MASP-1 e MASP-2 e tem afinidade similar pelas MBL e ficolinas. Essas proteínas competem com MASP-1 e MASP-2, mas não podem clivar C2 e C4. Ainda, o inibidor de C1 também pode interferir na ativação dessa via por meio da inibição de MASP-1 e MASP-2 (MERLE et al., 2015a).

A via alternativa está constantemente ativada em baixos níveis, permitindo a resposta imediata a patógenos invasores (REIS et al., 2019). O sistema de ativação da via alternativa é formado por C3, fatores B, D e properdina e é regulada pelos

fatores H e I. C3 é uma molécula central na via alternativa, abundante no plasma e praticamente inerte em sua forma nativa. No entanto, uma pequena fração dessa molécula sofre hidrólise espontânea e forma C3(H₂O). O fator B é uma protease que se liga ao C3(H₂O) e é clivada pelo fator D, formando a C3 convertase inicial C3(H₂O)Bb. C3(H₂O)Bb cliva então moléculas de C3 nativas em C3a e C3b na presença de íons magnésio. Paralelamente, a properdina atua de forma semelhante às moléculas de reconhecimento das outras vias e reconhece PAMPs. C3b é então atraído para a superfície do patógeno reconhecido pela properdina e o mesmo se liga ao fator B, que é novamente clivado pelo fator D. Forma-se então o complexo C3bBb, que constitui a C3 convertase definitiva da via alternativa (MERI, 2016; RICKLIN et al., 2010).

Todas as C3 convertases ligadas à superfície do patógeno, independentemente de sua via de origem, podem induzir amplificação da via alternativa por meio da ativação de C3. A molécula de C3b resultante é rapidamente depositada nas superfícies próximas do local de ativação e forma a C3 convertase majoritária da via alternativa, C3bBb, na presença de fator B e fator D. Cria-se assim um eficiente ciclo de clivagem de C3 e montagem de convertase que amplifica a cascata significativamente (RICKLIN et al., 2010). A atividade das C3 convertases é regulada pelo fator I, uma serinoprotease presente no plasma que cliva C3b e C4b na presença de diferentes cofatores. O principal cofator para clivagem de C3b é o fator H, enquanto para C4b é proteína ligadora de C4b (*C4b binding protein*, C4BP). Além de clivar C3b e C4b, o fator I também pode atuar na dissociação das C3 convertases (MERLE et al., 2015a).

A amplificação da via alternativa aumenta consideravelmente a quantidade de C3b disponível e leva à formação gradual de convertases que contém uma molécula extra de C3b (C4b2a3b ou C3bBb3b), mudando a especificidade do substrato de C3 para C5. Essas C5 convertases clivam C5 em C5a e C5b. Enquanto C5a é uma anafilotoxina que está envolvida em processos de regulação da resposta inflamatória originada com o reconhecimento inicial do patógeno, C5b está envolvido na ativação da via terminal (RICKLIN et al., 2010).

A clivagem de C5 provoca mudanças estruturais significativas na molécula de C5b e a ligação à C6 é necessária para estabilização de sua estrutura. A seguir, C5b6 se liga à C7 e o complexo formado se insere no envoltório do patógeno. Então, C8 se liga à C5b7 e induz a ligação de diversas moléculas de C9 no complexo C5b8,

culminando na formação do complexo de ataque à membrana (*membrane attack complex*, MAC ou C5b9_n) (MERLE et al., 2015^a; RICKLIN et al., 2010). O MAC constitui um poro transmembrana inserido na membrana do patógeno, que provoca a sua eliminação por lise osmótica (MORGAN; BOYD; BUBECK, 2017). Enquanto bactérias Gram negativas são bastante susceptíveis, as Gram positivas possuem uma parede celular muito espessa, o que impede a inserção do MAC e as torna resistentes a eliminação pelo complemento (MERLE et al., 2015a).

A formação do MAC é minuciosamente controlada para evitar o dano acidental de tecidos do hospedeiro e para tal, C8 desempenha um papel duplo de formação e regulação do complexo. A formação do poro só é bem sucedida quando C8 se liga a um complexo C5b7 previamente inserido em um envoltório celular. Do contrário, a ligação de C8 a C5b7 induz alterações conformacionais que resultam na perda da habilidade de formação MAC (MERLE et al., 2015a). Ainda, alguns patógenos são capazes de reparar o dano provocado pelo MAC em seus envoltórios (MERLE et al., 2015b).

Outra forma de eliminação de patógenos pelo sistema complemento é a opsonização. Trata-se da deposição de fragmentos de C3b na superfície dos patógenos alvo, permitindo o seu reconhecimento, internalização e destruição por células fagocitárias como neutrófilos, monócitos e macrófagos, que expressam receptores específicos para esses fragmentos. Ainda, a opsonização resultante da ativação direta da via alternativa permite a eliminação do patógeno antes mesmo que a imunidade adaptativa seja ativada (MERLE et al., 2015b).

1.5 Mecanismos de resistência à ação bactericida do soro

A capacidade de resistir à ação bactericida do soro humano é um pré-requisito essencial para a sobrevivência e disseminação do patógeno na corrente sanguínea do hospedeiro. Importantes estratégias de evasão ao sistema complemento, o principal responsável por essa atividade bactericida e que é rapidamente ativado após o primeiro contato com o invasor, já foram identificadas em diversos patógenos e têm como alvo diferentes pontos da ativação e regulação desse sistema (ABREU; BARBOSA, 2017; FERNÁNDEZ; GÓMEZ; VEJA, 2019; MIAJLOVIC; SMITH, 2014).

Dentre essas estratégias destacam-se o mimetismo molecular de moléculas reguladoras do complemento, a clivagem direta de moléculas do sistema por

proteases secretadas, o sequestro e aquisição de reguladores do complemento produzidos pelo hospedeiro e a interferência da sinalização celular com anafilotoxinas. Enquanto alguns patógenos se desvencilham pela ação de fatores de virulência que interagem com pontos específicos da cascata de reações envolvidas na ativação e regulação do complemento, outros empregam mais de uma estratégia de evasão de forma a assegurar o bloqueio efetivo do sistema (ABREU; BARBOSA, 2017; FERNÁNDEZ; GÓMEZ; VEJA, 2019).

Os principais mecanismos de resistência ao soro utilizados por *E. coli* estão descritos na Tabela 1. Dentre eles, destaca-se a produção de proteases de diferentes classes, envolvidas no bloqueio da ativação do sistema complemento com alvos em diferentes pontos do sistema (ABREU; BARBOSA, 2017). As serinoproteases Pic e EsP, membros da família das Serinoproteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs) possuem ação proteolítica sobre diferentes moléculas da cascata de ativação e juntamente com os outros membros dessa família, constituem importantes fatores de virulência envolvidos na patogênese de *E. coli* (ABREU et al., 2015, 2016; ORTH et al., 2010; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

Tabela 1 – Principais mecanismos de resistência ao soro utilizados por *E. coli*.

Grupo	Fator de virulência	Mecanismo	Referência
Cápsula polissacarídica	Cápsulas dos grupos 2, 3 e 4	Barreira estérica que confere proteção à membrana externa da deposição de moléculas do complemento e fagocitose Sequestro de fator H por meio da ligação com ácido siálico	Meri; Pangburn, 1994; Whitfield, 2006; Biran; Rosenshine; Ron, 2020
Proteases	EspP	Clivagem direta de C3/C3b e C5	Orth et al., 2010
	Pic	Clivagem direta de C2, C3/C3b e C4/C4b	Abreu et al., 2015, 2016
	StcE	Potencializa C1-IHN e diminui ativação da via clássica	Lathem; Bergsbaken; Welch, 2004
	Prc	Interfere com a ativação da via clássica e deposição do MAC	Wang et al., 2012
Proteínas de membrana externa	OmpA	Interage com C4BP, permitindo a inativação de C3b e C4b mediada por fator I	Prasadarao et al., 2002; Wooster et al., 2006
	OmpW	Ligação ao fator H, impede ativação da via alternativa	Li et al., 2016
	Nlpl	Deposição de C4BP na superfície da bactéria e evita a ativação da via clássica	Tseng et al., 2012
Protectinas	TraT (lipoproteína de membrana externa)	Apresentemente inibe estágios finais da atividade do MAC e a formação do complexo C5b6 Também pode afetar a deposição de C3b na superfície bacteriana e afetar a permeabilidade da membrana externa	Binns; Mayden; Levine, 1982; Aguero et al., 1984; Sukupolvi; O'Connor, 1987
	Iss (proteína de sobrevivência ao soro aumentada)	Apresentemente interfere com os complexos finais do MAC	Binns; Mayden; Levine, 1982

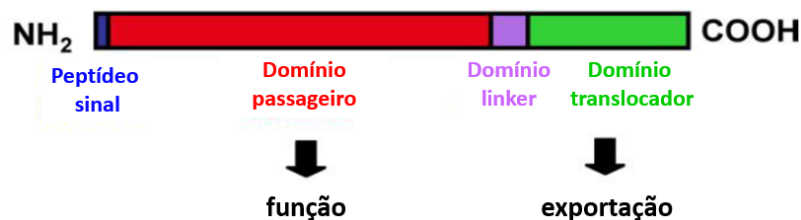
1.6 Serinoproteases autotransportadoras da família Enterobacteriaceae

As Serinoproteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs) constituem uma superfamília de fatores de virulência secretados para o meio extracelular e altamente prevalentes entre enteropatógenos, incluindo *E. coli* e *Shigella*. Essas proteases possuem estrutura e funcionalidade muito semelhantes e degradam substratos intra e/ou extracelulares, levando a diversos efeitos danosos nas células hospedeiras (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Uma de suas principais características é o fato de que essas proteases estão entre as proteínas mais secretadas por seus respectivos patógenos (DAUTIN, 2010; HENDERSON; NATARO, 2001).

1.6.1 Características moleculares

As SPATEs são enquadradas na categoria das serinoproteases tripsina-*like* e denominadas autotransportadoras devido à estrutura de sua molécula e sistema de secreção utilizado para a sua translocação para o meio externo. A estrutura geral dessas proteases é formada por três domínios funcionalmente distintos: um peptídeo sinal na extremidade N-terminal, um domínio passageiro e um domínio translocador na extremidade C-terminal (Figura 3) (POKHAREL et al., 2019; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014; YEN et al., 2008).

Figura 3 – Estrutura molecular das SPATEs.



Fonte: Adaptado de Dautin (2010).

O peptídeo sinal contém de 48-59 resíduos de aminoácidos e possui uma estrutura bastante convencional, com a extremidade N-terminal bem conservada (com cerca de 25 resíduos de aminoácidos). Está envolvido na translocação das SPATEs através da membrana interna, uma vez que possui uma sequência sinal reconhecida pelo sistema Sec-translocase. Já o domínio translocador é bastante conservado, contendo exatamente 277 resíduos de aminoácidos em todas as SPATEs, com identidades variáveis entre 60-99%. Também é conhecido como domínio β e adquire a conformação de um β -barril ao se inserir na membrana externa da bactéria, permitindo a passagem do domínio passageiro para o meio extracelular. Por fim, o domínio passageiro é o responsável pelas funções efetoras das SPATEs. Ele varia em tamanho (entre 954 e 1050 resíduos de aminoácidos) e identidade (23-50%) e após a sua secreção, adquire a conformação rica em folhas β e se dobram em uma estrutura helicoidal de folhas paralelas. Na sua extremidade N-terminal, encontra-se o motivo conservado de serinoproteases (GDSSGS, onde a primeira serina constitui o sítio catalítico), responsável pelas propriedades proteolíticas das SPATEs. Os domínios passageiros e translocador estão unidos por um pequeno domínio em forma de α -hélice denominado de domínio *linker*, onde existe um sítio conservado FxxEVNNLNK que sofre autoproteólise para liberação do domínio passageiro no meio externo (DAUTIN, 2010; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

1.6.2 Secreção para o meio externo

Os sistemas de secreção de proteínas utilizados por bactérias patogênicas são essenciais para sua virulência e estão agrupados de acordo com o seu mecanismo, composição e relação evolutiva (DURAND et al., 2009). Em bactérias Gram negativas essas maquinarias podem ser divididas em duas categorias: as que estão inseridas tanto na membrana interna como na externa, incluindo os sistemas de secreção do tipo I, II, III, IV e VI, e as que estão inseridas apenas na membrana externa, incluindo o sistema de secreção do tipo V (SST5) e os sistemas chaperona-*usher* e curli (tipos VII e VIII, respectivamente) (COSTA et al., 2015; FAN et al., 2016).

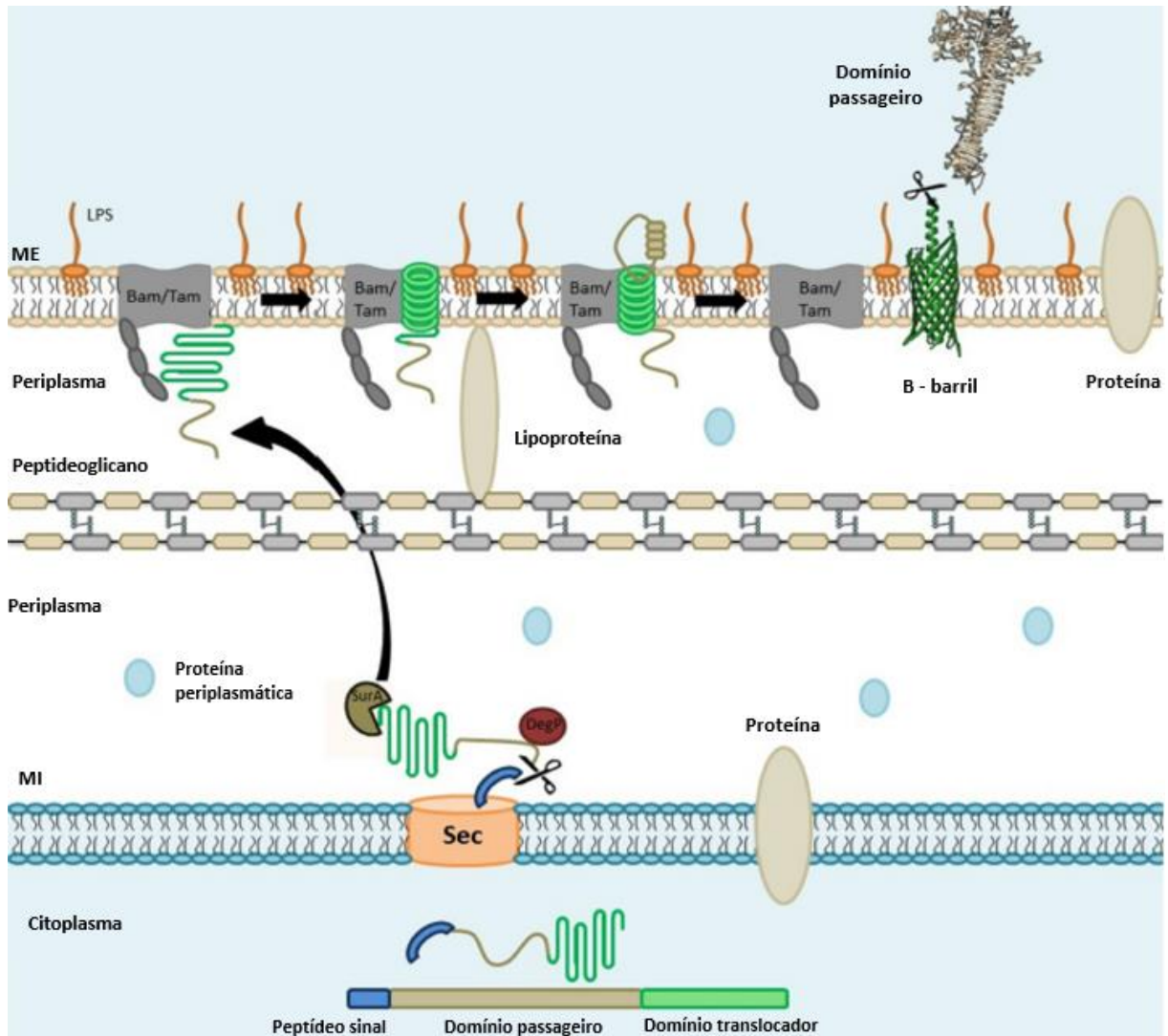
O sistema de secreção do tipo V (SST5) é exclusivo das bactérias Gram negativas, uma vez que se insere apenas na membrana externa. Em comparação com os outros sistemas de secreção, sua estrutura é muito mais simples e sua fonte de

energia para o transporte de proteínas é desconhecida, uma vez que não há energia disponível no periplasma. Ainda, a estrutura das proteínas secretadas por esse sistema sugere que todos os elementos necessários para a sua translocação para o meio externo estão codificados na sua própria molécula. Todas essas características fizeram que o SST5 também fosse conhecido como via autotransportadora. No entanto, demonstrou-se ao que o SST5 depende de outros dois complexos proteicos, denominados Sistema Sec e Complexo Bam, para a translocação de proteínas através das membranas interna e externa, respectivamente (HENDERSON et al., 2004; MEUSKENS et al., 2019).

As variações observadas no SST5 levaram à sua classificação em cinco diferentes subclasses (Va-e), considerando suas diferenças estruturais e de seus processos de biogênese. O SST5a é considerado o protótipo clássico de secreção das autotransportadoras e é a via utilizada para a secreção das SPATEs (BERNSTEIN, 2019; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

O processo de secreção das SPATEs pode ser observado na Figura 4. Após a tradução, a molécula da SPATE sofre a ação da chaperona citoplasmática SecB, que a reconhece através de seu peptídeo sinal e impede o dobramento da molécula. SecB direciona seus substratos para a ATPase SecA, que por sua vez, direciona a proteína para o canal SecYEG. O peptídeo sinal é então clivado e a SPATE é secretada no periplasma, onde permanecerá em sua forma não dobrada através da ação das chaperonas periplasmáticas SurA, Skp e DegP. A proteína BamA, componente do complexo Bam, promove a montagem e inserção do β -barril da SPATE na membrana externa, de maneira que um poro seja formado e haja a passagem do domínio passageiro para o meio externo, a partir da sua extremidade C-terminal. Após o término da translocação, ocorre uma autoproteólise catalisada pelo β -barril entre as duas asparaginas presentes no sítio conservado do domínio *linker* e o domínio passageiro é liberado para o meio extracelular (COSTA et al., 2015; GREEN; MECSAS, 2016; HENDERSON et al., 2004; LEYTON; ROSSITER; HENDERSON, 2012; MEUSKENS et al., 2019).

Figura 4 – Secreção das SPATEs para o meio externo.



Fonte: Adaptado de Pokharel et al. (2019).

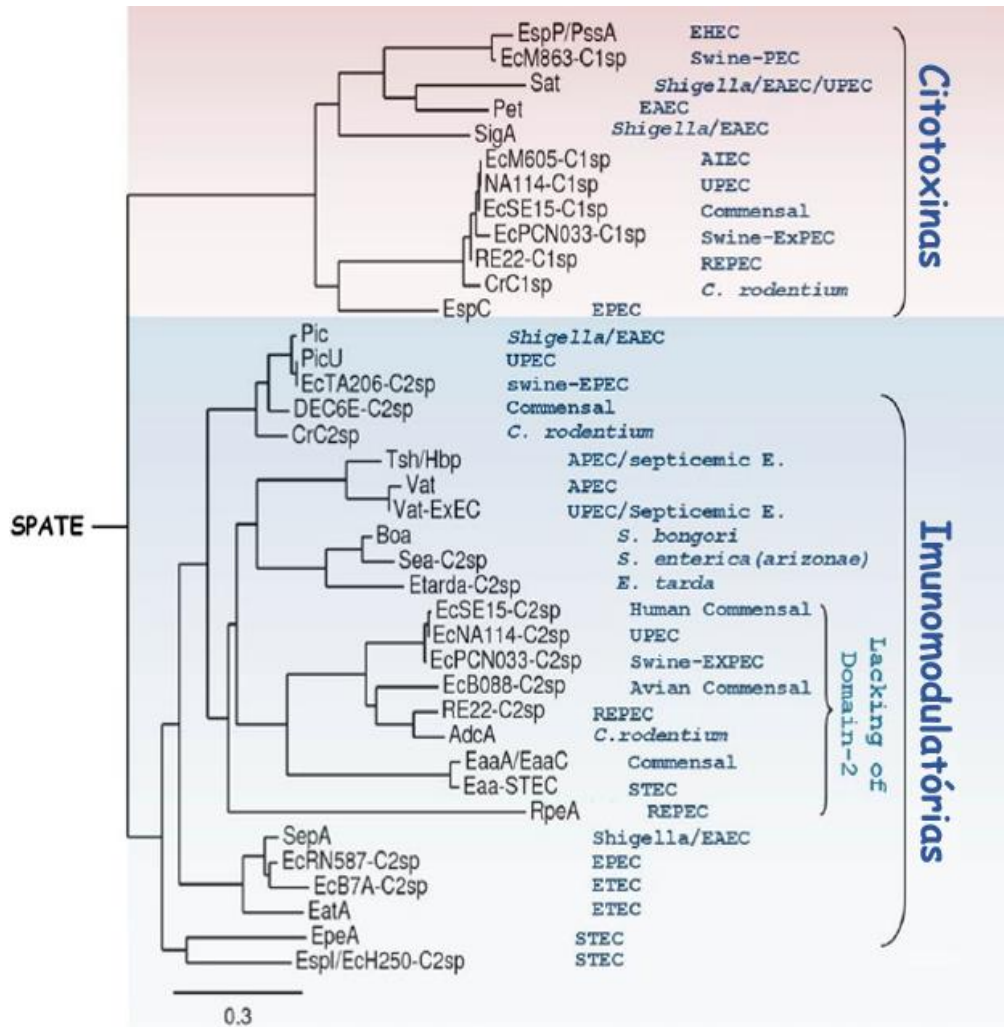
LPS: Lipopolissacarídeos; ME: membrana externa; MI: membrana interna.

1.6.3 Classificação das SPATEs

Os domínios passageiros de cada uma das SPATEs são os responsáveis pelas suas propriedades de virulência, como citotoxicidade e interação com componentes no sistema imune. A análise das características e sequências de aminoácidos desses domínios permite a divisão dessa família de proteases em duas classes, que apresentam diferentes especificidades por substratos e funções biológicas, conforme

demonstrado na Figura 5 (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014; YEN et al., 2008).

Figura 5 – Classificação das SPATEs.



Fonte: Adaptado de Ruiz-perez e Nataro (2014).

As SPATEs de classe 1 são conhecidas pela sua ação citotóxica em cultura de células ou atividade de enterotoxina em tecidos intestinais (DUTTA et al., 2002; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). As SPATEs EspP (BRUNDER; SCHMIDT; KARCH, 1997), Sat (GUYER et al., 2000), Pet (ESLAVA et al., 1998), SigA (AL-HASANI et al., 2000) e EspC (MELLIES et al., 2001) são os membros desta classe que já foram caracterizados. Já a classe 2 compreende as SPATEs com atividade mucinolítica, que resulta em vantagens para colonização de mucosas e modulação imune (DUTTA et

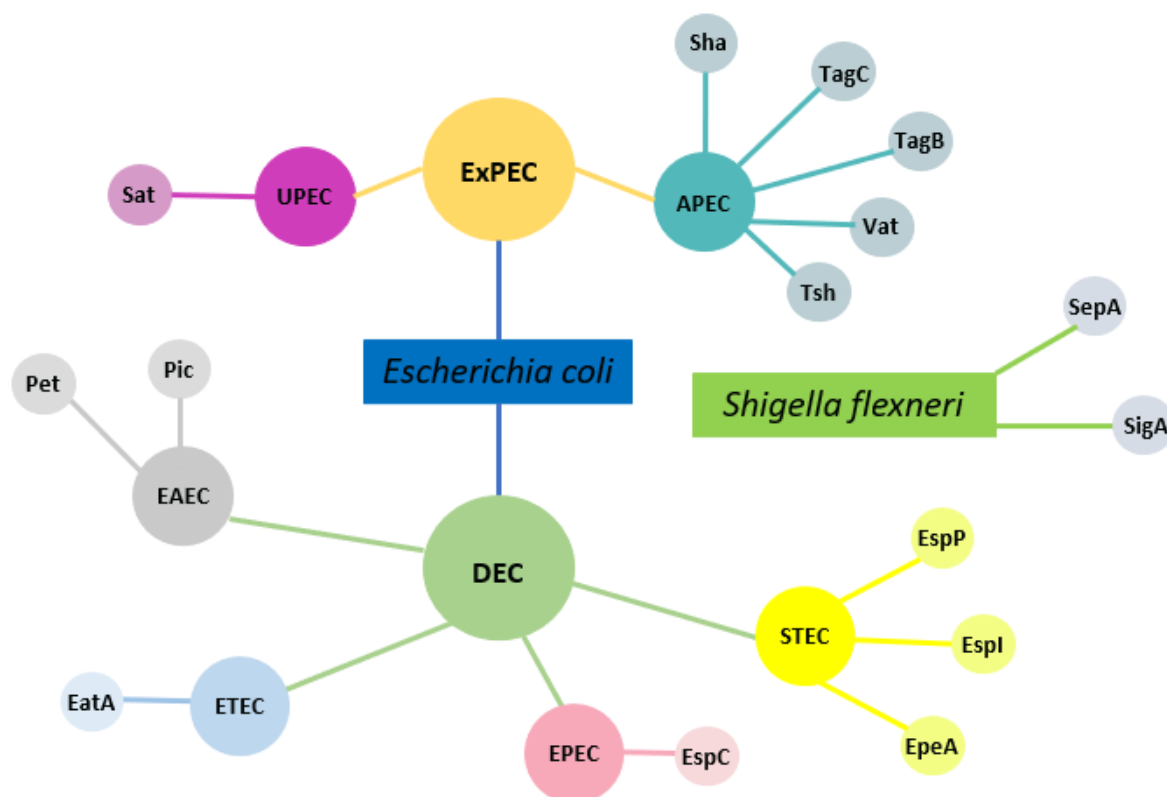
al., 2002; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Os membros já caracterizados dessa classe são Pic (HENDERSON et al., 1999), Tsh (PROVENCE; CURTISS, 1994), Vat (PARREIRA; GYLES, 2003), SepA (BENJELLOUN-TOUIMI; SANSONETTI; PARSOT, 1995), EatA (PATEL et al., 2004), EpeA (LEYTON et al., 2003) e EspI (SCHMIDT et al., 2001). No entanto, uma sobreposição de funções entre as classes tem sido observada. Orth et al. (2010) demonstrou que EspP, uma SPATE de classe 1 com efeitos citotóxicos bem caracterizados, também exerce ação proteolítica sobre moléculas do sistema complemento *in vitro*, enquanto Andrade (2019) demonstrou que SepA, uma SPATE de classe 2, tem ação citotóxica sob diversos tipos celulares.

Recentemente, três novas SPATEs foram caracterizadas por Habouria et al. (2019). A análise comparativa de suas sequências preditas de aminoácidos demonstrou que as SPATEs TagB e Sha pertencem a classe 2, enquanto TagC pertence a classe 1. Apesar dessa divisão, as três SPATEs apresentaram efeitos citopáticos e atividade de hemaglutinação em diferentes condições (HABOURIA et al., 2019; POKHAREL et al., 2020), evidenciando mais uma vez essa sobreposição de funções.

1.6.4 Frequência das SPATEs entre os patótipos de *E. coli*

Os membros já caracterizados da família das SPATEs foram primeiramente descritos em diferentes patótipos de *E. coli* e em *Shigella flexneri* (Figura 6), estando envolvidos em importantes estágios da patogênese de doenças intestinais e extraintestinais. O fato de os genes que codificam SPATEs estarem presentes em elementos móveis como plasmídeos, pró-fagos ou ilhas de patogenicidade favorece a transferência horizontal de genes e permite que as SPATEs não permaneçam restritas a um determinado patótipo. No entanto, análises de coleções de *E. coli* isoladas de diarreia, ITU e ICS realizadas nos últimos anos demonstram a maior frequência de uma determinada SPATE em isolados pertencentes ao patótipo em que a mesma foi primeiramente descrita (DAUTIN, 2010; TAPADER et al., 2014).

Figura 6 – Patótipos de *E. coli* e *S. flexneri* relacionados à primeira descrição das SPATEs caracterizadas até o momento.



Fonte: Freire (2020) (este trabalho).

No que diz respeito à presença de genes que codificam SPATEs em ExPEC, dois trabalhos avaliaram de forma abrangente a frequência desses genes em cepas de *E. coli* isoladas da corrente sanguínea. Tapader et al. (2014) e Mandomando et al. (2020), verificaram a maior frequência de *vat* (51% e 19,5%, respectivamente) e *sat* (39% e 10%, respectivamente) entre as cepas analisadas, enquanto baixas frequências de *pic* (9% e 6%, respectivamente) e outros genes de SPATEs primeiramente descritos em DEC, como *espP*, *sepA*, *sigA*, *eatA* e *pet*, foram detectadas. Outros estudos envolvendo cepas isoladas de corrente sanguínea, mas com foco no perfil geral de virulência das cepas, verificaram a presença de *sat* e *vat* em frequências que variaram entre 25-70% e 40-70%, respectivamente (ANANIAS; YANO, 2008; CLERMONT et al., 2017; MAHJOUR-MESSAI et al., 2011; MAMANI et al., 2019; MIAJLOVIC et al., 2016; MORA-RILLO et al., 2015; PARHAM et al., 2005; RAGUPATHI et al., 2020; SKJØT-RASMUSSEN et al., 2012; USEIN et al., 2015).

Considerando as pesquisas realizadas em coleções de UPEC, *sat* é o gene mais frequentemente encontrado seguido por *vat*, *pic* e *tsh* (MIRANDA-ESTRADA et al., 2017; MOMTAZ et al., 2013; MOSTAFAVI et al., 2019; RESTIERI et al., 2007; VILA et al., 2002).

O inverso pode ser observado nos trabalhos que avaliam a prevalência dos genes codificantes de SPATEs em coleções de DEC. Os genes *pic*, *pet*, *sepA*, *sigA* e *espC* foram consideravelmente mais prevalentes em diversos estudos (ABREU et al., 2013; ANDRADE et al., 2017; HAVT et al., 2017; JENSEN et al., 2017; RESTIERI et al., 2007; SPANO et al., 2017; ZUDE; LEIMBACH; DOBRINDT, 2014). No entanto, frequências consideráveis de *sat* também foram detectadas em isolados de EAEC e DAEC (BOISEN et al., 2009, 2012; GUIGNOT et al., 2007; HAVT et al., 2017; JENSEN et al., 2017; SPANO et al., 2017; TADDEI et al., 2003).

A alta frequência de *sat* em isolados de quadros extraintestinais e de patótipos de DEC com potencial extraintestinal conhecido, como EAEC e DAEC (BOLL et al., 2020; LARA et al., 2017; MANDOMANDO et al., 2020; NUNES et al., 2017; SERVIN, 2005; SILVA, 2019), sugere que esta SPATE possa estar envolvida em importantes estágios da patogênese de infecções extraintestinais. Os efeitos citotóxicos de Sat em diversos tipos celulares e sobre diferentes substratos estão bem descritos na literatura e serão detalhados, juntamente com outras características desta SPATE, a seguir.

1.6.5 *Secreted autotransporter toxin (Sat)*

A proteína Secreted Autotransporter Toxin (Sat) foi descrita e caracterizada pela primeira vez por Guyer et al. (2000), na cepa protótipo de UPEC CFT073 (MOBLEY et al., 1990). O gene *sat*, de 3.888 pb, foi identificado na ilha de patogenicidade II desta cepa e codifica uma protease de 142 kDa, que após a perda de seu peptídeo sinal e domínio translocador no processo de secreção para o meio extracelular, constitui uma proteína funcional de 107 kDa. A sequência predita de aminoácidos de Sat tem identidade e similaridade consideráveis, respectivamente, com as SPATEs Pet (63%; 75%), EspP (56%; 70%), EspC (50%; 66%), pertencentes a classe 1, e Pic (40%; 55%), pertencente a classe 2 (GUYER et al., 2000). Sat é uma SPATE de classe 1 e seus efeitos citotóxicos bem caracterizados na literatura (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014; VIEIRA et al., 2020).

Em estudos realizados com a cepa UPEC CFT073, verificou-se a ocorrência de efeitos citopáticos atribuídos a essa SPATE em células de linhagens originadas do trato urinário, como a alongação e destacamento de células Vero (célula de rim de macaco verde africano) e HK-2 (célula humana epitelial de bexiga), e a vacuolização citoplasmática de células de CRL-1749 e CRL-1573 (células humanas epiteliais provenientes de bexiga e rim, respectivamente). Ainda, observou-se também a alta imunogenicidade de Sat em um modelo de infecção urinária ascendente em camundongos, onde a cepa selvagem e seu respectivo mutante isogênico em *sat* foram testados. A presença ou ausência de Sat neste modelo não alterou a colonização do trato urinário pelas cepas, mas importantes alterações histológicas nos rins dos camundongos infectados com a cepa selvagem foram observadas, como a dissolução da membrana glomerular e vacuolização das células dos túbulos proximais. Com esses achados, Sat passou a ser considerada um importante determinante de virulência envolvido na patogênese de UPEC (GUYER et al., 2000, 2002). Em estudo posterior, Maroncle et al. (2006) verificaram que Sat é internalizada pelas linhagens CRL-1749 e HEK-293 (célula humana embrionária de rim) e se localiza no citoesqueleto. Juntamente com a observação da atividade proteolítica de Sat sobre a α -fodrina e espectrina, proteínas envolvidas na estabilização da estrutura da membrana e da manutenção da forma célula, os autores sugerem que os efeitos citopáticos de Sat estão associados com o dano ao citoesqueleto ou a outras proteínas a ele associadas, contribuindo para a ocorrência das alterações epiteliais observadas nas ITU (Maroncle et al., 2006). Finalmente, também foi verificado que estes efeitos são atribuídos ao resíduo de serina presente na posição 256 da sequência de aminoácidos de Sat, que corresponde ao sítio ativo de serinoprotease das SPATEs. Em um estudo de caracterização funcional de Sat, Dutta et al. (2002) identificaram a espectrina e o fator V de coagulação como substratos de Sat.

Estudos envolvendo cepas de DEC produtoras de Sat também foram realizados. Taddei et al. (2005) demonstraram a perda da forma fibroblástica de células Y1 (célula murina proveniente de carcinoma adrenocortical) e a atividade enterotóxica de Sat no modelo de alça ligada de intestino de coelhos, após a inoculação das alças com a toxina obtida da cepa DAEC FBC 114 (TADDEI et al., 2005). Guignot et al. (2007) verificaram a partir de diferentes cepas de DAEC que o rearranjo de proteínas associadas as *tight junctions* de células Caco-2/TC7 (clone derivado da linhagem Caco-2, célula humana proveniente de adenocarcinoma

colorretal) e aumento da permeabilidade celular, enquanto Moal et al. (2011) demonstraram que Sat provoca um destacamento celular autofágico em células HEp-2 (célula humana proveniente de carcinoma de laringe contaminada com células HeLa). Recentemente, Vieira et al. (2020) demonstraram a partir de cepas de EAEC, que a toxina é internalizada por células Caco-2 polarizadas e provoca a perturbação da F-actina, com consequente destacamento celular. Ainda, efeitos citotóxicos bastante intensos foram observados em células HUVEC (célula endotelial humana originada da veia umbilical), sugerindo que Sat pode estar envolvida na patogênese de infecções da corrente sanguínea e da sepse.

Curiosamente, o gene *sat* está presente no genoma da cepa probiótica de *E. coli* Nissle 1917. No entanto, Toloza et al. (2015) verificaram que esta cepa produz a respectiva protease funcional, mas ela não atua como fator de virulência devido a inibição por outro(s) componente(s) do sobrenadante de cultura da cepa probiótica.

Apesar de uma sobreposição de funções biológicas entre as classes de SPATEs ter sido observada ultimamente, não há relatos na literatura de possíveis atividades imunomodulatórias de Sat. No entanto, a alta frequência do gene *sat* em ExPEC isolada da corrente sanguínea (MANDOMANDO et al., 2020; TAPADER et al., 2014) e a atividade citotóxica demonstrada sobre células endoteliais (VIEIRA et al., 2020) e originadas do trato urinário (GUYER et al., 2000, 2002; MARONCLE et al., 2006) sugerem o envolvimento desta SPATE na patogênese das infecções da corrente sanguínea. Considerando que o sistema complemento é uma das primeiras linhas de defesa do sistema imune inato a ser enfrentado por um patógeno ao entrar na corrente sanguínea, levantou-se a hipótese de que Sat pode auxiliar na evasão do sistema imune por meio da clivagem de moléculas do sistema complemento.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo caracterizar as atividades biológicas da SPATE Sat relacionadas à evasão do sistema imune inato por *E. coli*.

2.1 Objetivos específicos

- Verificar a frequência do gene *sat* e outros genes que codificam SPATEs em uma coleção de cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com bacteremia.
- Verificar a produção de Sat pela cepa de trabalho e purificar a protease a partir do seu sobrenadante de cultura.
- Caracterizar o contexto genético do gene *sat* em uma cepa de trabalho escolhida a partir da referida coleção.
- Avaliar o efeito proteolítico de Sat purificada sobre as moléculas purificadas do sistema complemento.
- Avaliar o envolvimento de Sat na resistência ao soro *in vitro* da cepa de selvagem e construções genéticas derivadas.
- Avaliar o envolvimento de Sat no desenvolvimento da sepse em um modelo murino.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pesquisa do gene *sat* e de outros genes que codificam SPATEs em cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia humana

3.1.1 Características das cepas analisadas

Foram analisadas 278 cepas de *E. coli* provenientes do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo e pertencentes à coleção ENTEROBACTERIALES - EXTRAINTESTINAL – EPM – DMIP, mantida pela Disciplina de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (DMIP/EPM/UNIFESP).

Tais cepas foram obtidas a partir de hemoculturas de pacientes de ambos os gêneros, diferentes idades e condições clínicas internados no Hospital São Paulo (São Paulo, Brasil) no período entre 2000 e 2008, apresentando quadro de bacteremia. O isolamento e identificação das cepas foram realizados no laboratório clínico do próprio hospital.

3.1.2 Reativação das cepas e obtenção de DNA

As cepas permaneceram estocadas a -80°C e foram recuperadas por incubação em caldo Luria-Bertani (LB) (Difco, Reino Unido). Para checar a pureza das colônias, os inóculos foram semeados em ágar MacConkey (Difco) e, posteriormente, repicados ágar LB (Difco), de forma a obter colônias para extração de DNA. Todos os meios citados foram incubados a 37°C durante 18 h, após as respectivas semeaduras.

Cerca de duas a cinco colônias obtidas no ágar LB foram adicionadas a um microtubo de 1,5 mL contendo 500 µL de água ultrapura estéril. Após homogeneização, a mistura foi submetida à fervura por 10 min e em seguida a um choque térmico a 4°C por 5 min. Finalmente, a mistura foi centrifugada a 800 x g por 10 min. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para um microtubo estéril e armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.1.3 Pesquisa de genes que codificam SPATEs

Além do gene *sat*, os seguintes genes que codificam SPATEs foram pesquisados por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): *vat*, *tsh*, *espl*, *espC*, *espP*, *sepA*, *pic*, *eatA*, *epeA*, *pet* e *sigA*. Para cada reação foram utilizados os seguintes componentes (Invitrogen, EUA): 0,2 μ M de cada um dos iniciadores específicos (*forward* e *reverse*), 2,5 U de *Taq DNA Polymerase Recombinant*, 1,5-2,0 mM de MgCl₂, 5,0 μ L de tampão de PCR 1x, 0,2 mM da mistura de dNTPs, 1,0 μ L de DNA e água milliQ estéril para um volume final de 25 μ L. As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler® gradient* (Eppendorf, Alemanha), no seguinte esquema de ciclagem: 94°C por 5 min; 30 ciclos: 94°C por 1 min, respectiva temperatura de anelamento (indicada na Tabela 2) por 1 min e 72°C por 1 min; 72°C por 5min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 0.7%, preparado em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X corado com *Unisafe dye®* (Uniscience, Brasil) e utilizando o padrão de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen). A corrida eletroforética foi também realizada em TBE 0,5X a 100 V, por aproximadamente 45 min. Após a corrida, os géis foram expostos a luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec, Reino Unido) para captura da imagem.

As cepas utilizadas como controle positivo para cada gene e os iniciadores específicos utilizados estão indicados na Tabela 2. A cepa de *E. coli* DH5 α foi usada como controle negativo em todas as reações.

Tabela 2 – Iniciadores específicos utilizados na pesquisa de genes que codificam SPATEs.

Gene	Sequência	Temperatura de Anelamento (°C)	Produto (pb)	Controle positivo	Referência
<i>sat</i>	(F) TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG (R) CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	59	930	DAEC FBC114	Boisen et al. (2009)
<i>espl</i>	(F) ATGGACAGAGTGGAGACAG (R) GCCACCTTTATTCTCACCA	54	560	EHEC EH250	Schmidt et al. (2001)
<i>espC</i>	(F) GACAGTTTTACGTTAGCTGG (R) TCCTGCCGAAAACCGAAGC	55	1099	EPEC E2348/69	Andrade et al. (2017)
<i>espP</i>	(F) GTCCATGCAGGGACATGCCA (R) TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	55	547	EHEC EDL933	Restieri et al. (2007)
<i>sepA</i>	(F) GGTTGATGTTTCTATTATGAACA (R) CGCATCATATTTCCACTG	55	1031	<i>S. flexneri</i> M90T	Este estudo (N.º Acesso GenBank: Z48219.1)
<i>pic</i>	(F) GGAAGTGACAGGGCATTG (R) CTTCGTATTGCCACCACTG	56	1011	EAEC 042	Abreu et al. (2016)
<i>eatA</i>	(F) TTGGCGTTCTGTCATCAGGA (R) CCTTACCAGAGAGTGGATG	57	1068	EAEC BA179	Andrade et al. (2017)
<i>epeA</i>	(F) GGGAGAGTTCAGGCATTTA (R) CAGCGTTACCTTACTTGAG	57	783	<i>E. coli</i> EH41	Abreu et al. (2013)
<i>pet</i>	(F) GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT (R) CCTCTTGTTTCCACGACATAC	58	302	EAEC 042	Restieri et al. (2007)
<i>sigA</i>	(F) CCGACTTCTCACTTTCTCCCG (R) CCATCCAGCTGCATAGTGTTTG	58	430	<i>S. flexneri</i> M90T	Boisen et al. (2009)
<i>vat</i>	(F) AACGGTTGGTGGCAACAATCC (R) AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	58	420	<i>E. coli</i> RS218	Restieri et al. (2007)
<i>tsh</i>	(F) CCGTACACAAATACGACGG (R) GGATGCCCTGCAGCGT	59	300	APEC O1	Restieri et al. (2007)

3.2 Caracterização da cepa EC071

Após a verificação da frequência gene *sat* e dos outros genes que codificam SPATEs na coleção de cepas isoladas de bacteremia, a cepa EC071 foi escolhida como cepa protótipo para avaliação da hipótese do envolvimento da proteína Sat na resistência à ação bactericida do soro por meio da clivagem de moléculas do sistema complemento.

O critério inicial para sua escolha foi a presença do gene *sat* e a ausência de todos os outros genes que codificam SPATEs pesquisados por PCR no genoma da EC071, de forma a evitar possíveis interferências de outras SPATEs (especialmente aquelas com ação sobre as moléculas do complemento) nas análises subsequentes. Após essa verificação inicial, uma caracterização mais detalhada da EC071 foi realizada através do sequenciamento completo do seu genoma e de alguns ensaios fenotípicos, de forma que os seguintes critérios foram considerados para sua escolha definitiva:

- Confirmação da presença do gene *sat* e da ausência de outros genes que codificam SPATEs;
- Produção da proteína Sat;
- Ausência de genes relacionados a mecanismos de resistência ao soro conhecidos, mas ainda assim apresentar o fenótipo de resistência a ação bactericida do soro humano;

Paralelamente, a cepa EC071 também foi avaliada quanto a sua virulência intrínseca, sorotipo e classificação filogenética a partir da sequência completa de seu genoma. Ainda, o contexto genético de *sat* nessa cepa também foi verificado por meio da análise do perfil plasmideal da cepa protótipo.

Todas as análises realizadas para a escolha da cepa protótipo estão detalhadas a seguir.

3.2.1 Sequenciamento completo do genoma da EC071

3.2.1.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico da cepa EC071 foi extraído com auxílio do *GeneJet Genomic DNA Purification Kit* (ThermoFisher Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extração, a qualidade do DNA extraído foi analisada em gel de agarose a 1% (conforme descrito no item 3.1.3) e sua quantificação realizada com o *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen).

3.2.1.2 Sequenciamento na plataforma Illumina e processamento dos dados

O DNA extraído foi enviado para o Setor MicrobesNG da University of Birmingham (Reino Unido), onde o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina HiSeq (Illumina, EUA) utilizando um protocolo paired end de 250bp. Foram utilizados o *Nextera XT Library Prep Kit* e o *Nextera XT Index Kit* (Illumina) para preparação de biblioteca, o *V2 HiSeq Rapido Cluster PE-HS Kit* (Illumina) para clusterização e o *Truseq Rapido SBS Kit v2 (500 cycles)* (Illumina) para sequenciamento, sempre seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante.

As sequências obtidas foram pré-processadas pelo software Trimmomatic 0.30 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) e a montagem *de novo* foi realizada com a versão 3.7 do software SPAdes (NURK et al., 2013). Por fim, os *contigs* obtidos foram anotados utilizando a versão 1.11 do software Prokka (SEEMANN, 2014).

3.2.1.3 Análise do genoma completo da cepa protótipo

A análise da qualidade do sequenciamento foi realizada por meio da plataforma QUAST (GUREVICH et al., 2013).

A presença do gene *sat*, a ausência de genes que codificam outras SPATEs e de genes conhecidos relacionados com a resistência à ação bactericida do soro, além da verificação da presença/ausência dos genes relacionados à virulência intrínseca de ExPEC foi realizada no genoma da cepa EC071 através da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) em comparação com os genomas de cepas

de referência depositados no *Genbank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e no *ecoli VF collection* (https://github.com/aleimba/ecoli_VF_collection). Ainda, a sequência predita de nucleotídeos e aminoácidos do gene *sat* das cepas EC071 e CFT073 foi comparada para análise de identidade e verificação da integridade do sítio de serinoprotease através do software BioEdit (versão 7.2.5) e da plataforma Blast.

A predição *in silico* do sorotipo e a determinação do *Sequence Type* (ST) foi realizada com a ferramenta MLST e a verificação da presença de plasmídeos foi realizada com a ferramenta PlasmidFinder, ambas pertencentes à plataforma online do *Center for Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org>). A confirmação do filogruppo foi realizada na plataforma online ClermontTyping (<http://clermonttyping.iame-research.center/>) (BEGHAIN et al., 2018). A presença das ilhas de patogenicidade da cepa UPEC CFT073 no genoma da cepa EC071 foi realizada com o auxílio da plataforma Blast, em comparação com as sequências depositadas no banco PAIDB v2.0 (<http://www.paidb.re.kr>) (YOON; PARK; KIM, 2015). Finalmente, o *contig* obtido que alberga o gene *sat* foi também analisado quanto à presença de sequências de inserção nas regiões flancoadoras de *sat* com o auxílio da plataforma Blast, considerando o banco de dados específico dessas sequências (*insertion sequences* - TaxID:2673).

3.2.2 *Determinação do contexto genético de sat na EC071*

3.2.2.1 Análise do perfil plasmideal da EC071

A extração plasmideal da cepa EC071 foi realizada conforme descrito por Birnboim e Doly (1979). A cepa 39R861 (THRELFALL et al., 1966) foi utilizada como controle, uma vez que possui quatro plasmídeos de massa molecular conhecida. A composição das soluções utilizadas nesse protocolo está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 – Soluções utilizadas na análise do perfil plasmideal.

Solução	Composição
I	Lisozima 4 mg/mL, Glicose 2%, Na ₂ EDTA 10 mM e Tris-HCl 25 mM, pH 8,0
II	NaOH 0,2 N e SDS 1%
III	Acetato de sódio 3 M, pH 4,8
IV	Acetato de sódio 100 mM e Tris-HCl 50 mM, pH 8,0

Primeiramente, a cepa teste e as cepas de referência foram semeadas em 3 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubadas a 37°C/18 h. A seguir, 800 µL de cada cultura foram transferidos para microtubos estéreis de 1,5 mL e centrifugados a 13.400 x g durante 3 min. Os sobrenadantes foram então aspirados com bomba de vácuo e 100 µL da solução I foram adicionados a cada microtubo, de forma a ressuspender o sedimento com o auxílio de uma micropipeta. Os microtubos permaneceram em banho de gelo por 30 min e, após este período, 200 µL da solução II foram adicionados e misturados por inversão por cerca de seis a oito vezes. Após uma nova incubação em banho de gelo por sete minutos, 150 µL da solução III foram adicionados em cada microtubo e misturados gentilmente por inversão por cerca de 12 a 15 vezes, até que houvesse a formação de precipitado branco. Os microtubos com a mistura foram então incubados a 4°C durante 18h. Após este período, foram centrifugados a 13.400 x g por 10 min e todo o sobrenadante (cerca de 400 µL) foi transferido imediatamente para novos microtubos. Em seguida, 1 mL de etanol P.A. resfriado a -20°C foi adicionado a cada microtubo e cuidadosamente misturado por inversão por cerca de dez vezes, com posterior incubação a -20°C por 18 h. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados a 13.400 x g durante 10 min e o sobrenadante desprezado. O sedimento resultante da centrifugação foi suspenso em 100 µL da solução IV e cerca de 200 µL de etanol P.A. resfriado a -20°C foram adicionados para precipitar o DNA, como anteriormente descrito. Então, os microtubos foram novamente centrifugados a 13.400 x g por 10 min e, após desprezar o sobrenadante, foram colocados abertos e invertidos para total secagem à temperatura ambiente. Finalmente, o sedimento foi ressuspensionado em 15 µL de tampão TE (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH: 8,0). O DNA plasmideal obtido foi analisado em gel de agarose 0,8% conforme descrito no item 3.1.3.

3.2.2.2 Southern blot

A técnica de *Southern blot* foi empregada para determinar se o gene *sat* estava localizado em algum dos plasmídeos extraídos da cepa EC071. Após o registro fotográfico, o gel de agarose resultante da análise do perfil plasmideal (item 3.2.2.1) foi tratado com solução de HCl 0,25 M durante 30 min sob leve agitação. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e tratado com uma solução desnaturante NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M (solução) por 30 min sob agitação lenta. O gel foi novamente lavado com água destilada e tratado com uma solução neutralizante (Tris-HCl 1 M e NaCl 2 M) por 30 min sob leve agitação. Após esse tratamento, os plasmídeos foram transferidos para uma membrana de nylon *Hybond-N+ nylon membrane* (GE Healthcare, EUA) utilizando o sistema *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.2.2.3 Obtenção da sonda e hibridização

Inicialmente foi obtida a sonda genética para detecção de *sat* na reação de hibridização. Para isso, foi amplificado por PCR um fragmento correspondente a uma região de 930 pb do gene *sat* da cepa EC071, conforme descrito no item 3.1.3 e utilizando iniciadores específicos *sat* (Tabela 2). Após a amplificação, o produto foi analisado em gel de agarose 0,7% (conforme descrito no item 3.1.3) e em seguida foi purificado com auxílio do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A membrana de nylon resultante da transferência foi então submetida ao processo de hibridização, utilizando o kit *Amersham Gene Images AlkPHos Direct Labelling and Detection System* (GE Healthcare). A marcação do fragmento sonda *sat* e a hibridização (55°C por 18 h) foram realizadas conforme as instruções do fabricante. A revelação da membrana também foi feita com reagentes componentes do referido *kit* e o sinal de quimioluminescência emitido foi detectado pelo fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem.

3.2.3 Resistência à ação bactericida do soro humano da cepa EC071

A resistência à atividade bactericida do soro humano da EC071 foi avaliada conforme proposto por Henderson et al. (1999), com algumas modificações descritas a seguir.

Um pré-inóculo da cepa foi preparado em caldo LB (Difco) e incubado a 37°C por 18 h. Ao fim deste período, 1,0 mL do pré-inóculo foi transferido para 49 mL de caldo LB e incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm, por tempo suficiente até que o inóculo atingisse a densidade óptica 0,5 a 600 nm. O mesmo procedimento foi realizado para a cepa de *E. coli* DH5 α , utilizada no teste como controle de susceptibilidade à ação bactericida do soro humano normal.

Paralelamente, três microtubos de 1,5 mL foram preparados contendo soro humano normal obtido comercialmente (Sigma-Aldrich, EUA) e/ou PBS 0,01 M estéril, conforme indicado na Tabela 4. Um desses microtubos (denominado B) foi incubado a 56°C por 30 min, para inativação das proteínas do sistema complemento presentes no soro. Após o preparo, os três microtubos foram incubados a 37°C por 30 min.

Tabela 4 - Preparo dos tubos para teste de resistência à ação bactericida do soro.

Tubo	PBS 0,01M estéril (μL)	Soro humano (μL)
A	80	100
B	80	100
O	180	----

Em seguida, 20 μ L do inóculo da cepa foram adicionados aos três microtubos preparados. Dessa forma, o volume final de cada microtubo foi de 200 μ L e a concentração final de soro nos tubos que o continham foi de 50%. O conteúdo dos três microtubos foi homogeneizado e os microtubos A e B foram incubados a 37°C por 60 min.

Imediatamente após a adição do inóculo, 20 μ L do microtubo O foram coletados. Diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8}) desse volume em PBS 0,01 M estéril foram realizadas e semeadas em ágar MacConkey (Difco). Aos 30 e 60 min de incubação, 20 μ L do conteúdo dos microtubos A e B foram coletados, diluídos e

semeados conforme realizado para o microtubo O. Todas as placas de ágar MacConkey foram incubadas a 37°C por 18 h e após esse período as unidades formadoras de colônia (UFC) foram calculadas em relação ao volume (UFC/mL).

As contagens obtidas foram plotadas em um gráfico mostrando a relação tempo de incubação x UFC/mL, considerando a contagem de UFC/mL do microtubo 0 como o inóculo inicial (tempo 0) para todas as situações testadas.

3.2.4 *Verificação da produção de Sat pela cepa EC071*

3.2.4.1 Precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura com ácido tricloroacético

As proteínas do sobrenadante de cultura da cepa EC071 foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) de acordo com o protocolo proposto por Koontz (2014).

Primeiramente, um pré-inóculo dessa cepa foi preparado em caldo LB e incubado a 37°C por 18 h. Ao fim deste período, uma alçada do pré-inóculo foi transferida para três tubos de caldo LB e eles foram incubados a 37°C sob agitação de 250 rpm, durante 18 h.

Os inóculos resultantes foram centrifugados a 2.000 x g sob refrigeração a 4°C, por 15 min. Em banho de gelo, foram feitas alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes resultantes utilizando microtubos de 1,5 mL. Em cada uma delas foram adicionados 200 µL de TCA (Sigma-Aldrich) para uma concentração final de 20% e cada microtubo foi homogeneizado suavemente dez vezes por inversão. Em seguida, as alíquotas foram incubadas a -20°C por 18 h.

Após este período, as alíquotas foram centrifugadas a 16.000 x g por 25 min a 4°C, e seus sobrenadantes foram descartados. Em seguida foram adicionados 500 µL de acetona pura (Merck, Alemanha) resfriada a 4°C em cada tubo, sem homogeneizá-los, e os mesmos foram novamente centrifugados a 16.000 x g por 25 min a 4°C. O processo foi repetido e após o último descarte do sobrenadante, os tubos foram deixados com a tampa aberta por tempo suficiente para evaporação completa da acetona à temperatura ambiente. Os precipitados de cada tubo foram homogeneizados com 15 µL de solução de Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8.

As cepas produtoras de Sat EC233/93 (VIEIRA et al., 2020) e DAEC FBC 114 (TADDEI et al., 2003) foram submetidas ao mesmo protocolo e utilizadas como controle positivo. A cepa de *S. flexneri* M90T (BENJELLOUN-TOUIMI; SANSONETTI; PARSOT, 1995) foi utilizada como controle negativo.

3.2.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Sabendo que a proteína Sat madura tem peso molecular de 107 kDa, os precipitados resultantes foram desnaturados com β -mercapto-etanol a 96°C por 5 min e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970). Os géis foram preparados em duplicata, sendo um destinado à coloração por nitrato de prata e o outro destinado ao *Western Blotting* e Imunodeteção de Sat, conforme descrito adiante. Para os géis destinados à coloração por prata foram usados o *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards* (BioRad) ou o *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen). Para os géis destinados à imunodeteção foi usado o marcador pré-corado *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad).

A eletroforese foi inicialmente realizada a 60 V por 10 min e posteriormente a 100 V por 2 h, em tampão de corrida Tris-Glicina (tris (hidroximetil) aminometano 3%; glicina 14%; dodecil sulfato de sódio 1%).

3.2.4.3 Coloração por nitrato de prata

Um dos géis de poliacrilamida obtidos conforme descrito no item anterior foi submetido à coloração rápida por nitrato de prata (CHEVALLET; LUCHE; RABILLOUD, 2006) para visualização das proteínas. Inicialmente o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 50 mL solução fixadora (50% de etanol, 12% de ácido acético e 37% de formaldeído), aquecido a 65°C por 30 seg e mantido sob agitação por 5 min. A solução fixadora foi descartada e cerca de 50 mL de etanol a 30% foram adicionados, com posterior aquecimento a 65°C por 30 seg e agitação por 5 min. Após o descarte do etanol, cerca de 50 mL de uma solução de 0,02 % de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) foram adicionados e o recipiente foi aquecido novamente a 65°C por 30 seg e mantido sob agitação por 2 min. Em seguida, duas

lavagens com água destilada foram realizadas, sempre seguidas de aquecimento a 65°C por 30 seg e agitação por 2 min. Após o descarte da água utilizada na segunda lavagem, cerca de 50 mL de solução corante (0,2% de nitrato de prata e 0,05% de formaldeído) foram adicionados ao recipiente, com posterior aquecimento a 65°C por 30 seg e agitação por 5min. A solução corante foi descartada e o gel foi lavado novamente com água destilada, sob agitação por 1 min. Após a lavagem e descarte da água, foram adicionados cerca de 50 mL de solução reveladora (3% de carbonato de sódio e 0,05% de formaldeído) e o recipiente permaneceu sob agitação até que as bandas correspondentes às proteínas presentes no gel pudessem ser observadas. Finalmente, a solução reveladora foi descartada e cerca de 50 mL da solução de parada de reação (50% de etanol e 12% de ácido acético) foram adicionados.

3.2.4.4 Imunodeteção de Sat

O segundo gel de poliacrilamida obtido conforme descrito no item 3.1.4.2 foi transferido para uma membrana de nitrocelulose *Amersham™ Protran™ Supported 0.45 µm NC* (GE Healthcare) pela técnica de *Western Blotting* (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). A transferência foi realizada com auxílio do sistema *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad), utilizando o tampão de transferência (200 mL de metanol, 100 mL de Tris-glicina e 700 mL de água destilada) em corrente elétrica constante de 10 V por 45 min. A membrana resultante foi incubada em 20 mL da solução de bloqueio (5% de leite desnatado em PBS 0,01M com 0,05% de Tween-20 em) por 18 a h4°C. Em seguida, a mesma foi lavada três vezes com PBS 0,01 M contendo 0,05% de Tween-20, sob agitação por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada com 10 mL de uma diluição 1:500 do anticorpo policlonal de coelho anti-Sat (VIEIRA et al., 2020) por 1 h, sob agitação em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas três lavagens com PBS 0,01M com 0,05% de Tween-20 e a membrana foi então incubada com 10 mL de uma diluição 1:10000 do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) por 1 h, sob agitação em temperatura ambiente. A revelação foi realizada com o *SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante e o sinal de quimioluminescência emitido foi detectado pelo fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem.

3.3 Purificação de Sat a partir do sobrenadante de cultura da EC071

O protocolo utilizado para a purificação de Sat foi realizado conforme descrito por Maroncle et al. (2006), com algumas adaptações descritas a seguir.

3.3.1 Concentração do sobrenadante de cultura da EC071

Inicialmente foram preparados 20 mL de pré-inóculo da cepa EC071 em caldo LB, incubados a 37°C por 18 h. Após a incubação, dois frascos de 1 L contendo 500 mL de caldo LB cada foram inoculados com 10 mL de pré-inóculo em cada um deles e incubados a 37°C e 250 rpm até atingir a densidade óptica 1,0 em 600 nm.

A seguir, os inóculos foram centrifugados a 8.200 x g por 15 min a 4°C, e o sobrenadante de cultura obtido foi então filtrado em aparato de filtração com membranas de 0,22 µm *Stericup® and Steritop® Vacuum Driven Sterile Filters* (Merck), com auxílio de uma bomba a vácuo. O sobrenadante filtrado foi inicialmente concentrado até cerca de 10 mL utilizando os dispositivos concentradores *Amicon® Ultra 15 mL Centrifugal Filters* (Millipore, EUA) com *cut off* de 30 kDa e em seguida, até cerca de 1 mL utilizando um dispositivo concentrador com *cut off* de 50 kDa. As concentrações por filtração foram feitas com sucessivas centrifugações a 5.000 x g, por 20 min cada, sob refrigeração a 4°C.

3.3.2 Cromatografia em coluna de afinidade (troca iônica)

A purificação de Sat foi realizada em uma coluna aniônica empacotada com a resina *Q SepHarose Fast Flow* (GE Healthcare) e com os tampões descritos na Tabela 5. Todos os tampões, a água ultrapura e NaOH 1 M utilizados foram filtrados em membrana de 0,22 µm.

Tabela 5 - Tampões utilizados na cromatografia em coluna de troca iônica.

Tampão	Composição
A	0,025 M Tris HCl e 0,025 M NaCl; pH 7,5
B1	0,025 M Tris HCl e 0,1 M NaCl; pH 7,5
B2	0,025 M Tris HCl e 0,175 M NaCl; pH 7,5
B3	0,025 M Tris HCl e 0,250 M NaCl; pH 7,5
B4	0,025 M Tris HCl e 0,325 M NaCl; pH 7,5
B5	0,025 M Tris HCl e 0,400 M NaCl; pH 7,5
B6	0,025 M Tris HCl e 0,500 M NaCl; pH 7,5

Todo o processo foi realizado com um fluxo de vazão de 2 ml/min. Inicialmente, efetuou-se a limpeza da coluna com 50 mL de água ultrapura e em seguida a mesma foi equilibrada com 50 mL do tampão A. Então, o concentrado foi diluído no tampão A (volume do concentrado completado para 15 mL com o tampão) e injetado na coluna, sendo que a partir desse momento, as frações passaram a ser coletadas. Após todo o conteúdo ser injetado na coluna, ela foi lavada com cerca de 45 mL do tampão A e, em seguida, 15 mL de cada tampão de eluição (B1 a B6) foram injetados na coluna, seguindo o gradiente de concentração de NaCl entre os tampões. Após a passagem de todo o volume dos tampões de eluição, a coluna foi reequilibrada com 50 mL do tampão A. As frações foram coletadas até este ponto. Finalmente, a coluna foi lavada com 50 mL de NaOH 1 M e 50 mL de água mili-Q e armazenada em etanol 20% a 4°C

3.3.3 *Análise das frações obtidas na troca iônica*

As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração rápida por nitrato de prata, conforme descrito nos itens 3.2.4.2 e 3.2.4.3.

3.3.4 *Confirmação da identidade de Sat*

As frações que apresentaram uma banda única com massa molecular ao redor de 100 kDa no gel corado por nitrato de prata foram submetidas à imunodeteção com o soro específico anti-Sat, conforme descrito no item 3.2.4.4, e submetidas à análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) no

equipamento ESI-ITTOF (Shimadzu, Japão), realizada pelo Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

3.3.5 *Quantificação de Sat purificada nas frações*

A concentração de Sat nas frações purificadas foi determinada com o *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific), conforme as instruções do fabricante.

3.4 *Ensaio de clivagem das moléculas do complemento por Sat purificada*

Os ensaios proteolíticos foram realizados com a proteína Sat purificada do sobrenadante de cultura da EC071 e com as moléculas C1q, C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9 purificadas (Complement Technology, EUA), utilizando protocolos de clivagem simples e com inibição por fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) (Sigma-Aldrich) ou anti-Sat (VIEIRA et al., 2020).

3.4.1 *Ensaio proteolítico simples*

Nos ensaios proteolíticos simples, 5,0 µg de Sat purificada foram adicionados a diferentes tubos contendo de 0,5 a 1,0 µg de molécula alvo e quantidade suficiente de tampão MOPS (0,1 M MOPS, 0,2 M NaCl e 0,01 mM ZnSO₄, pH 7,3) (DUTTA et al., 2002; MARONCLE et al., 2006) para completar 50 µL de reação. Cada tubo foi incubado a 37°C por 24 h. Na quinta e na 24ª hora, 20 µL do conteúdo de cada tubo foram coletados e armazenados a -20°C. Tubos controle contendo apenas a solução de cada molécula do complemento em tampão MOPS também foram incubados pelo mesmo período e tiveram os mesmos volumes coletados, nos mesmos intervalos de tempo. Os produtos de incubação foram analisados por SDS-PAGE em géis de poli-acrilamida a 10% e imunodeteção com anticorpos primários específicos para a molécula do complemento testada (Complement Technology), conforme descrito nos itens 3.1.4.2 e 3.1.4.4. Os anticorpos primários foram utilizados nas seguintes diluições: 1:1.000 (anti-C2), 1:2.500 (anti-C4), 1:3.000 (anti-C6, anti-C7, anti-C8 e anti-C9) e 1:5.000 (anti-C1q e anti-C3). O anticorpo secundário anti-IgG de cabra

conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) foi utilizado na diluição 1:10.000 para todas as moléculas testadas.

3.4.2 Ensaios proteolíticos com inibição por PMSF

Nos ensaios proteolíticos com inibição por PMSF, as moléculas alvo do sistema complemento clivadas por Sat no ensaio proteolítico simples foram testadas em novas condições. Concentrações de 0,5 e 1,0 µg de molécula alvo foram incubadas juntamente com 0,5 µg ou 1,0 µg de Sat purificada ou Sat purificada previamente inativada com o inibidor de serinoproteases PMSF (Sigma-Aldrich). A inativação da serinoprotease se deu pela adição de um volume suficiente de uma solução a 50 mM de PMSF à Sat purificada de forma que a concentração final do inibidor fosse 1 mM. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30 min e posteriormente utilizada no teste. A preparação dos tubos controle, as incubações e análise dos produtos de incubação foram realizadas conforme descrito item anterior.

3.5 Construções genéticas

As construções do clone mínimo de expressão de Sat e de seu respectivo mutante sítio dirigido foram realizadas no Laboratório do Prof. Dr. Ian R. Henderson, no *Institute of Microbiology and Infection* da *University of Birmingham* (Birmingham, Reino Unido). Os demais experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil).

3.5.1 Indução de competência e quimiotransformação

Todas as transformações realizadas neste trabalho foram realizadas por choque térmico em células quimiocompetentes, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Um inóculo da cepa de interesse foi cultivado em 50 mL de caldo LB e incubado sob agitação de 250 rpm a 37°C e por tempo suficiente até que a densidade óptica de 0,6 fosse atingida em comprimento de onda de 600 nm. O inóculo foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e incubado em banho de gelo por 30 min. A seguir, o tubo foi centrifugado a 2.000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante de cultura foi descartado. O sedimento obtido foi então lavado

gentilmente com 50 mL de uma solução gelada de cloreto de cálcio 100 mM a 100 mM e incubado em banho de gelo por 20 min. Um novo ciclo de centrifugação e lavagem foi feito, dessa vez utilizando 25 mL de cloreto de cálcio 100 mM. Após uma nova centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de solução de cloreto de cálcio 100 mM acrescida de 15% de glicerol. Alíquotas de 100 µL dessa suspensão bacteriana foram feitas em microtubos de 1,5 mL e as mesmas foram rapidamente congeladas em banho de etanol (70%) e gelo seco, para posterior armazenamento a -80°C até o momento do uso.

As transformações foram realizadas da seguinte forma: o volume suficiente de produtos de ligação ou plasmídeo foi adicionado a 50 µL da alíquota de célula quimiocompetente apropriada. O tubo com a mistura foi então incubado em banho de gelo por 30 min, em seguida a 42°C por 95 seg e novamente em banho de gelo por 2 min. A mistura foi então recuperada em 500 µL de caldo TSB e incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm por 1 h. Após esse período, esse cultivo foi semeado em placas de ágar LB contendo o antibiótico apropriado para a seleção de transformantes e as placas foram incubadas a 37°C por 18 h.

3.5.2 Vetores e cepas utilizadas

As cepas e vetores utilizados nas construções genéticas deste estudo estão descritas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 - Cepas utilizadas nas construções genéticas.

Cepa	Origem	Sensibilidade a antibacterianos	Referência
EC071	<i>E. coli</i> isolada de bacteremia humana; ExPEC ⁺	Amp ^S (100 µg/mL); Kan ^R (50 µg/mL) Kan ^S (150 µg/mL); Tet ^R (15 µg/mL)	Freire et al. (2020)
DH5α	<i>E. coli</i> K-12	Sensível a todos os antibacterianos	Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989)
S17-1(λpir)	<i>E. coli</i> 294 com deleção em <i>recA</i>	Kan ^S (150 µg/mL); Tet ^S (15 µg/mL)	Simon; Profer; Pühler (1983)
MG1655	<i>E. coli</i> K-12	Sensível a todos os antibacterianos	Jensen (1993)

Tabela 7 - Vetores utilizados nas construções genéticas.

Plasmídeo	Descrição	Sítios de restrição para clonagem	Marcas de Resistência	Referência ou origem
<i>pGEM-T easy</i>	Vetor de alto número de cópias; 3,0 kb, Amp ^R (100 µg/mL)	EcoRI	Amp ^R (100 µg/mL)	Promega
<i>pJP5603</i>	Vetor suicida de baixo número de cópias contendo o replicon R6K; 3,1 kb,	EcoRI	Kan ^R (150 µg/mL)	Penfold; Pemberton (1992)
<i>pettac</i>	Modificação do vetor pET22b+, com promotor tac	NdeI XhoI	Amp ^R (100 µg/mL)	Serre et al. (2008)

3.5.3 Iniciadores utilizados e condições de PCR

Os iniciadores utilizados em cada etapa das construções genéticas realizadas estão descritos na Tabela 8. As reações de PCR foram realizadas de acordo com as especificações dos fabricantes de cada polimerase utilizada e utilizando o termociclador *Mastercycler[®] gradient* (Eppendorf). Após a amplificação, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,7%), seguindo a descrição no item 3.1.3. Diferente do descrito naquele item, nesta etapa alguns géis foram corados com *Midori Green* (Nippon genetics Europe, Alemanha) e o marcador de peso molecular foi o *HyperLadder[™] 1Kb* (Bioline, EUA).

Tabela 8 - Iniciadores utilizados para a obtenção das construções genéticas.

Iniciador	Sequência (5'→3')	Finalidade
<i>sat</i> NdeI F	GATACGCATATGAATAAAATATACTCCCTTAA	Amplificação do gene <i>sat</i> com sítios de restrição para clonagem no vetor <i>pettac</i>
<i>sat</i> XhoI R	GTA CTGCTCGAGTCAGAAAGAGTAACGGAAGTTGG	
NdeI <i>pettac</i>	CAGTCATGCTAGCCATATGTATATC	Amplificação do vetor <i>pettac</i>
XhoI <i>pettac</i>	GA ACTGTATAAATGATAACTCGAGCACCAC	
<i>pettac</i> F	ATGGTGCATGCAAGGAGATG	Sequenciamento para confirmação da clonagem do gene <i>sat</i>
<i>T7 terminator</i> R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
<i>sat sdm</i>	(F) GAAATATTCGGAGACATCGGCGCTGGAGCATACTTATATGATAAC (R) GTTATCATATAAGTATGCTCCAGCGCCGATGTCTCCGAATATTC	Amplificação do clone mínimo de <i>sat</i> com alterações de bases para mutação sítio dirigida
<i>sat2</i>	(F) GCTGGCTCTGGAGGAACAT (R) CCTTACCATTTCCGCTTGC	PCR de colônia para verificação de transformantes; Sequenciamento para confirmação da mutação sítio dirigida no gene <i>sat</i>
<i>M13</i>	(F) TGTA AACGACGGCCAGT (R) CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenciamento para confirmação da interrupção do gene <i>sat</i> pelo vetor suicida pJP5603
<i>Amp</i>	(F) CGAGTGGGTTACATCGAAC (R) CGCCTCCATCCAGTCTATTA	PCR de colônia para verificação de transformantes na complementação da cepa EC071::pCF2
<i>Kana</i>	(F) ACTCGTCGATCGGAATGATTGAACAAGATGGATTGC (R) CGATCCCGATCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG	Amplificação do cassete de resistência a canamicina

3.5.4 Extrações plasmideais e purificações de DNA

As extrações plasmideais foram realizadas com os kits *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) ou *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagem, Alemanha).

Os produtos de amplificação ou digestão foram diretamente purificados com o *Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit* (New England Biolabs, EUA) ou com o *QIAquick PCR purification Kit* (Qiagem). Os produtos de amplificação ou digestão obtidos após análise em gel de agarose 0,7% foram extraídos do gel e purificados com o *Monarch® DNA Gel Extraction Kit* (New England Biolabs). Em todos os casos, foram seguidas as instruções do fabricante.

3.5.5 Quantificação de DNA e sequenciamentos

Nos experimentos realizados no Brasil, as quantificações de produtos de amplificação e digestão purificados foram realizadas em análises eletroforéticas em gel de agarose (0,7%) em comparação com o marcador *Low DNA Mass Ladder* (ThermoFisher Scientific), enquanto a quantificação dos plasmídeos extraídos foi realizada no *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific). Nos experimentos realizados no Reino Unido, todas as quantificações de DNA foram realizadas com o *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

Todos os sequenciamentos foram realizados pelo método de Sanger no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL, IB-USP) ou na SourceBioscience (Oxford, Reino Unido).

3.5.6 Mutagênese do gene *sat* na EC071

A obtenção da cepa EC071 mutante em *sat* foi realizada pelo método de mutagênese não polar com o suicida pJP5603 (PENFOLD; PEMBERTON, 1992).

3.5.6.1 Clonagem do fragmento interno homólogo ao gene *sat* em pGEM-T easy

Inicialmente, um fragmento interno correspondente a uma região de 930 pb do gene *sat* da cepa EC071 foi obtido por meio de PCR, conforme descrito no item 3.1.3 utilizando o par de iniciadores específicos *sat* (Tabela 2). Após a análise em gel de agarose, o produto de PCR foi purificado e o fragmento foi então clonado no vetor *pGEM-T easy*, seguindo as instruções do fabricante.

Os produtos de ligação foram transformados em 50 µL de *E. coli* DH5α competente (item 3.5.1). Os transformantes foram selecionados em placas de ágar LB com ampicilina (100 µg/mL) e submetidos a extração plasmideal para confirmação da clonagem através de PCR para o fragmento interno de *sat*. Um transformante apresentando o gene *sat* clonado foi selecionado e o plasmídeo resultante foi denominado pCF1.

3.5.6.2 Subclonagem do fragmento homólogo à *sat* em pJP5603

O inserto do plasmídeo pCF1 foi em seguida subclonado no vetor suicida pJP5603 para posterior recombinação homóloga com a cepa selvagem. Cerca de 1,0 µg dos plasmídeos pJP5603 e pCF1 foram então digeridos com a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen) a 37°C por 3 h. Após a digestão o plasmídeo pJP5603 foi tratado com a enzima fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIP, Invitrogen) por 1 h a 37°C. Os dois produtos de digestão foram analisados em gel de agarose a 0,7%. O inserto liberado a partir da digestão de pCF1 foi extraído do gel, purificado e quantificado, enquanto o pJP5603 digerido foi diretamente purificado da reação de digestão e quantificado. Os produtos de digestão purificados foram então submetidos ao protocolo de ligação com a enzima T4 DNA ligase e seu respectivo tampão de reação (Invitrogen), na proporção inserto:vetor de 3:1. A mistura de ligação (volume final de 20 µL) foi incubada a 23°C por 1 h e imediatamente transformada em 50 µL de *E. coli* S17-1(λpir) competente (item 3.5.1). Os transformantes foram selecionados em placas de ágar LB com canamicina (150 µg/mL) e submetidos a extração plasmideal para confirmação da clonagem através de PCR para o fragmento interno de *sat*. Um transformante apresentando o gene *sat* clonado foi selecionado e o plasmídeo resultante foi denominado pCF2.

3.5.6.3 Conjugação

As cepas EC071 e S17-1(λ pir) albergando o pCF2 foram submetidas ao protocolo de conjugação (ELIAS et al., 1999), constituindo as cepas receptora e doadora, respectivamente. Inóculos de cada uma dessas cepas foram feitos em caldo LB e incubados a 37°C por 18 h, sem agitação. Uma membrana filtrante de 0,22 μ m previamente esterilizada foi posicionada no centro de uma placa de ágar MacConkey e 200 μ L de cada inóculo foram gotejados em cima dessa membrana. Após a secagem completa da membrana, a placa foi incubada a 37°C por 18 h. A seguir, a membrana foi transferida para o interior de um tubo cônico de 50 mL contendo 5 mL de caldo LB e todo o seu conteúdo foi homogeneizado de forma que todo o crescimento presente na membrana se desprendesse e ficasse diluído no caldo LB. Alíquotas de 1 mL do caldo resultante foram feitas em microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 13.400 x g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi ressuspenso em 100 μ L de caldo LB novo. As suspensões obtidas foram semeadas em placas de ágar MacConkey com canamicina (150 μ g/mL) e tetraciclina (15 μ g/mL) para seleção de transconjugantes, após incubação a 37°C por 18 h.

3.5.6.4 Confirmação da inserção do pCF2 no gene sat EC071 e ausência da produção de Sat

Para a verificação da inserção do pCF2 no gene *sat* da EC071, os transconjugantes selecionados foram submetidos a PCR com diferentes combinações de iniciadores *sat* e *M13*: *sat* F e *M13* R; *sat* R e *M13* F; *sat* F e *M13* F; *sat* R e *M13* R (Tabelas 2 e 8, respectivamente). As reações foram realizadas com a *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen), conforme descrito no item 3.1.3.

Após análise em gel de agarose, os produtos obtidos foram extraídos do gel para posterior purificação, quantificação e envio para o sequenciamento com a respectiva combinação de iniciadores *sat/M13*. Um clone foi selecionado após a confirmação da inserção do pCF2, inativando o gene *sat* da cepa EC071. O mutante obtido neste protocolo foi denominado EC071::pCF2 e a ausência da produção de Sat por esta cepa foi verificada por SDS-PAGE e imunodeteção com anti-Sat, conforme descrito no item 3.2.4.

3.5.7 Construção do clone mínimo de expressão de *Sat*

3.5.7.1 Seleção do vetor e desenho de iniciadores com sítios de restrição

A partir da análise da sequência do gene *sat* no genoma da cepa protótipo EC071 e de suas marcas de resistência, selecionou-se o vetor *pettac* (SERRE et al., 2008) para construção do clone mínimo. Este vetor é derivado do pET22b+, onde o operon *lac* e o promotor T7 foram substituídos pelo promotor *tac*, de forma a permitir que o plasmídeo seja expresso de forma constitutiva pela bactéria.

Considerando o sítio múltiplo de clonagem do vetor *pettac* e os sítios de restrição presentes na sequência do gene *sat* da EC071, foram desenhados iniciadores com sítios de restrição para as enzimas NdeI e XhoI (*sat*NdeI *F* e *sat*XhoI *R*, respectivamente) para obtenção do inserto correspondente à *sat* de aproximadamente 3,9 kb (Tabela 8).

3.5.7.2 Amplificação e digestão do inserto e do vetor

O inserto *sat* (3,9 kb) foi obtido por PCR a partir do DNA genômico da cepa EC071 (item 3.2.1.1), com o par de iniciadores *sat*NdeI e *sat*XhoI (Tabela 8). O vetor (5,3 kb) também foi obtido por PCR usando como DNA molde o plasmídeo *pettac mcherry* previamente extraído da hospedeira DH5 α , com o par de iniciadores NdeI*pettac* e XhoI*pettac* (Tabela 8).

As reações foram realizadas com a *Phusion® High Fidelity DNA polymerase* (New England Biolabs). A seguinte ciclagem de temperaturas foi utilizada: 98°C por 2 min; 30 ciclos: 98°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 5 min; 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 0,7%, purificados e quantificados (itens 3.5.4 e 3.5.5).

Posteriormente, cerca de 1 μ g de inserto e de vetor foram então digeridos a 37°C por 3 h com as enzimas NdeI e XhoI em tampão *Cutsmart Buffer 6X* (New England Biolabs), conforme instruções do fabricante. No caso do vetor, na última hora de incubação também foi adicionada a enzima CIP (New England Biolabs). Os produtos de digestão foram analisados em gel de agarose (0,7%), purificados e quantificados (itens 3.5.4 e 3.5.5).

3.5.7.3 Ligação e transformação

O inserto e o vetor digeridos e purificados foram submetidos ao protocolo de ligação com a enzima T4 DNA ligase e seu respectivo tampão de reação (New England Biolabs), de acordo com as proporções inserto:vetor de 0:1, 1:1 e 3:1. As misturas de ligação (volume final de 20 µL) foram incubadas em gelo por 20 min e depois em temperatura ambiente por 18 h. Cerca de 5 µL da mistura de reação foram transformados em 50 µL de *E. coli* DH5α competente (item 3.5.1) e os transformantes foram selecionados em ágar LB contendo ampicilina (100 µg/mL).

3.5.7.4 Confirmação da clonagem do gene *sat* no vetor *pettac*

Os transformantes selecionados foram testados por PCR de colônia com par de iniciadores *sat2* (Tabela 8) e usando a polimerase *MyTaq™ HS Red Mix* (Bioline), com a seguinte ciclagem de temperaturas: 95°C por 5 min; 30 ciclos: 95°C por 15 seg, 55°C por 15 seg e 72°C por 1 min; 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose (0,7%) para verificação da presença de um produto de 766 pb (item 3.1.3). Uma colônia com resultado positivo no PCR foi selecionada e inoculada em caldo LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C e 180 rpm por 3 h, para posterior extração plasmideal, quantificação e sequenciamento com o par de iniciadores *pettac F/ T7 terminator R* (Tabela 8). O clone mínimo resultante deste protocolo foi denominado pCF3.

3.5.7.5 Verificação da produção de Sat pelo clone mínimo de expressão

A verificação da expressão de Sat pelo clone pCF3 foi realizada por SDS-PAGE e imunodeteção com o soro específico anti-Sat, conforme descrito no item 3.2.4.

3.5.8 *Mutagênese sítio dirigida no clone mínimo de Sat*

O protocolo utilizado para mutagênese sítio dirigida no sítio ativo de serinoprotease de Sat foi baseado no *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, EUA), conforme descrito a seguir.

3.5.8.1 Desenho de iniciadores para mutação sítio-dirigida

Utilizando o clone pCF3 como molde, foram realizadas duas mutações sítio dirigidas no gene *sat*, na região correspondente ao sítio catalítico de serinoprotease GDSGS, onde a primeira serina constitui o sítio catalítico. Dessa forma, o mutante resultante seria capaz de expressar uma proteína não funcional, aqui denominada Sat'. Essas mutações consistiram na troca do resíduo de serina da posição 256 por uma isoleucina (S256I) e a troca do resíduo de serina da posição 258 por uma alanina (S258A) (MARONCLE et al., 2006). Para tal, um par de iniciadores com uma troca de nucleotídeo nos códons correspondentes aos aminoácidos alvo foram desenhados e denominados *sat sdm* (Tabela 8), de forma que todo o clone pudesse ser amplificado e as mutações fixadas nos novos moldes para as ampliações seguintes.

3.5.8.2 Amplificação para fixação das mutações e tratamento dos produtos com a enzima DpnI

A amplificação foi realizada com a enzima high fidelity *Velocity DNA polymerase* (Bioline). As condições para amplificação foram as seguintes: 98°C por 30 seg; 30 ciclos: 98°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 5 min e 30 seg; 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 0,7% e a presença de um produto com cerca de 9,2 kb foi verificada.

A seguir, os produtos da amplificação foram diretamente digeridos com a enzima DpnI (New England Biolabs) a 37°C por 1 h, para que todo DNA remanescente do clone utilizado como molde fosse degradado.

3.5.8.3 Transformação dos produtos de amplificação

Após o tratamento com DpnI, 10 µL de cada produto de digestão foram transformados em 50 µL de *E. coli* DH5α competente (item 3.5.1) e os transformantes foram selecionados em ágar LB contendo ampicilina (100 µg/mL).

3.5.8.4 Confirmação da mutação sítio dirigida no gene *sat*

Um dos transformantes obtidos foi inoculado em 3 mL de caldo LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubado a 37°C por 18 h, para posterior extração plasmideal, quantificação e sequenciamento com os iniciadores *sat2* (Tabela 8), uma vez que os mesmos amplificam a região do sítio ativo de serinoprotease de Sat. O mutante sítio dirigido resultante deste protocolo foi denominado pCF4.

3.5.8.5 Verificação da produção de Sat' pelo mutante sítio dirigido

A verificação da expressão de Sat' por pCF4 foi realizada por SDS-PAGE e imunodeteccção com anti-Sat, conforme descrito no item 3.2.4.

3.5.9 Complementação do mutante EC071::pCF2

3.5.9.1 Transformação de pCF3 e pCF4

A complementação do mutante EC071::pCF2 foi realizada com os plasmídeos pCF3 e pCF4 (obtidos nos itens 3.5.7.4 e 3.5.8.4, respectivamente). Para tal, duas alíquotas de 50 µL de EC071::pCF2 competentes (item 3.5.1) foram transformadas com 2 µL de um dos referidos plasmídeos e a seleção de transformantes foi realizada em placas de ágar LB com canamicina (150 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL).

3.5.9.2 Confirmação da complementação de EC071::pCF2

Os transformantes obtidos foram testados por PCR de colônia com par de iniciadores *Amp* (Tabela 8) usando *Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen) e com a seguinte ciclagem de temperaturas: 94°C por 5min; 30 ciclos: 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min; 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose (0,7%) para verificação da presença de um produto de 513 pb, conforme descrito no item 3.1.3. Os transformantes com resultado positivo na PCR foram denominados EC071::pCF2 (pCF3) e EC071::pCF2 (pCF4).

3.5.9.3 Confirmação da expressão de Sat e Sat' pelas cepas complementadas

A verificação da expressão de Sat e Sat' por EC071::pCF2 (pCF3) e EC071::pCF2 (pCF4), respectivamente, foi realizada por SDS-PAGE e imunodeteção com anti-Sat, conforme descrito no item 3.2.4.

3.5.10 *Transformação das construções pCF3 e pCF4 na cepa MG1655*

As construções pCF3 e pCF4 também foram transformadas na cepa de *E. coli* K-12 MG1655 para posterior análise no modelo animal de sepse. Para tal, duas alíquotas de 50 µL da cepa MG1655 competentes (item 3.5.1) foram transformadas com 2 µL de um dos referidos plasmídeos e a seleção de transformantes foi realizada em ágar LB com ampicilina (100 µg/mL). Os transformantes obtidos foram testados por PCR de colônia com par de iniciadores *Amp* (Tabela 8), conforme descrito no item 3.5.9.2. Os transformantes obtidos foram denominados MG1655(pCF3) e MG1655(pCF4) e respectiva expressão de Sat e Sat' foi realizada por SDS-PAGE e imunodeteção com anti-Sat, conforme descrito no item 3.2.4.

3.6 *Curva de crescimento das cepas CFT073, EC071, MG1655 e respectivas cepas derivadas*

As curvas de crescimento das cepas CFT073, EC071, MG1655 e suas respectivas cepas derivadas foram obtidas correlacionando as leituras de absorbância das respectivas culturas em determinados intervalos de tempo.

Inicialmente foi obtido um pré-inóculo de cada cepa em 3 mL de caldo LB contendo o antibiótico apropriado quando indicado após incubação a 37°C por 18 h. A seguir, 500 µL do pré-inóculo foram transferidos para 50 mL de caldo LB ou caldo LB contendo o antibiótico apropriado e incubado a 37°C e 250 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada 30 min durante 6 h, através de leituras de absorbância em comprimento de onda de 600 nm. Ainda, alíquotas correspondentes a cada intervalo de tempo foram diluídas seriadamente conforme descrito no item 3.1.3 e cada diluição foi semeada em ágar MacConkey para determinação da correspondência entre absorbância e UFC/mL em cada intervalo de tempo.

Três replicatas biológicas foram realizadas e o valor médio da leitura das absorbâncias em cada intervalo de tempo e sua contagem de UFC/mL correspondente foram plotados nos gráficos “absorbância x tempo” e “UFC/mL x absorbância”, respectivamente.

3.7 Resistência das cepas derivadas da cepa EC071 à ação bactericida do soro humano

As cepas EC071::pCF2, EC071::pCF2(pCF3) e EC071::pCF2(pCF4) foram submetidas ao ensaio de resistência a ação bactericida ao soro, conforme descrito no item 3.2.3. A cepa selvagem EC071 e a cepa DH5 α foram incluídas no ensaio como controles.

Os resultados obtidos foram analisados no pacote estatístico GraphPad Prism versão 7.00, por meio dos testes estatísticos Anova e comparações múltiplas de Tukey, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

3.8 Modelo animal de sepse

3.8.1 Cepas testadas e preparo dos inóculos

As cepas testadas no modelo animal e suas características estão descritas na Tabela 9. As cepas UPEC CFT073 e MG1655 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

Inicialmente, foi realizado um pré-inóculo de cada cepa em 3 mL de caldo LB contendo o antibiótico apropriado, quando indicado, incubado a 37°C por 18 h. A seguir, 500 μ L do pré-inóculo foram transferidos para 50 mL de caldo LB contendo o antibiótico apropriado, quando indicado, e incubado a 37°C e 250 rpm, por tempo suficiente até atingir a densidade óptica a 600nm correspondente a 10^9 UFC/mL (verificada no item 3.5). Então, 1 mL desta cultura foi centrifugado a 800 x g por 15 min e o sedimento foi lavado duas vezes com solução salina (0,9%). Finalmente, o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de solução salina (0,9%) para posterior inoculação de 200 μ L (concentração final do inóculo = 2×10^8 UFC/mL) em cada camundongo utilizado (PICARD et al., 1999).

Tabela 9 - Cepas testadas no modelo murino de sepse.

Cepa	SPATE produzida	Virulência intrínseca
EC071	Sat	ExPEC ⁺
EC071::pCF2	nenhuma	ExPEC ⁺
EC071::pCF2 (pCF3)	Sat	ExPEC ⁺
EC071::pCF2 (pCF4)	Sat'	ExPEC ⁺
MG1655 (pCF3)	Sat	ExPEC ⁻
MG1655 (pCF4)	Sat'	ExPEC ⁻
CFT073	Sat, PicU e Vat	ExPEC ⁺
MG1655	nenhuma	ExPEC ⁻

3.8.2 Descrição do modelo

O modelo murino de sepse foi realizado conforme descrito por Picard et al. (1999), após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA nº 30/2016) e da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (Protocolo CEUAIB nº 5743060220).

Camundongos swiss fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas e peso entre 20 e 30 g foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Cada grupo experimental, correspondente a uma das cepas testadas, utilizou 8 animais. Para os grupos controle, foram utilizados 4 animais por cepa.

Os animais foram inoculados por via subcutânea na região da nuca com 200 µL da suspensão bacteriana obtido conforme descrito anteriormente. Após o inóculo, os animais foram observados a cada hora nas seis primeiras horas, na 18^a hora e diariamente (3 vezes por dia), até que se completem sete dias da inoculação.

As observações clínicas foram realizadas com a ajuda da Médica Veterinária Dra. Renata Gemio dos Reis, da Divisão de Desenvolvimento de Científico do Instituto Butantan, e parâmetros como prostração, pelos eriçados, formação de edema, desidratação e perda de peso foram considerados (BLÄTTNER et al., 2016). Para cada sinal observado, uma pontuação foi atribuída (Anexo A) e a somatória final desses pontos definiu o prosseguimento ou encerramento do experimento para aquele animal no momento da observação. Animais com pontuação igual ou superior a 4 ou

que sobreviveram até o sétimo dia de experimento foram eutanasiados com uma associação de xilazina (30 mg/kg) e cetamina (300 mg/kg) injetada por via intraperitoneal.

Logo após a morte do animal, fígado, baço e rins foram coletados e imediatamente macerados em 1 mL de solução salina (0,9%) com auxílio do disruptor de tecidos Omi Myxer (OMNI-TH). Após a maceração, os órgãos foram diluídos seriadamente conforme descrito no item 3.2.3 e cada diluição foi semeada em ágar MacConkey, contendo o antibiótico apropriado quando indicado, para determinação da contagem de UFC/g órgão.

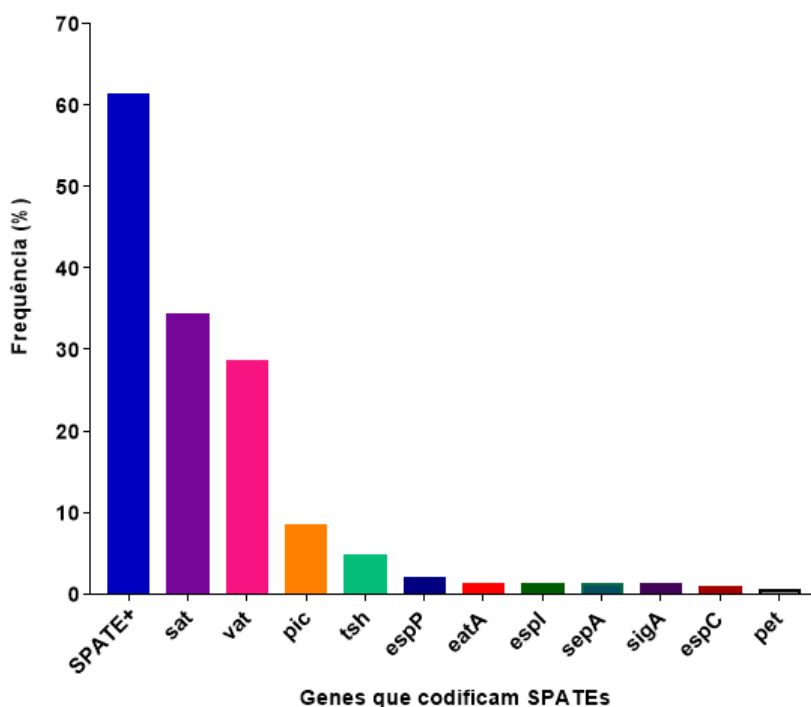
Os resultados obtidos foram analisados no pacote estatístico GraphPad Prism versão 7.00. A letalidade de cada cepa testada foi analisada através do teste exato de Fisher e a contagem de UFC/mL de cada órgão foi comparada entre os grupos experimentais por meio dos testes estatísticos Anova e comparações múltiplas de Tukey. Em ambas as análises, foi utilizado um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1 Pesquisa do gene *sat* e de outros genes que codificam SPATEs em cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia humana

A varredura realizada na coleção de cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia humana compreendeu a pesquisa de 12 genes codificantes de SPATEs, incluindo o gene *sat*, e este resultado pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 – Frequência dos genes que codificam SPATEs nas cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia analisadas.



Das 278 cepas analisadas, 170 delas albergavam pelo menos um desses genes (cepas SPATE⁺). A análise individual dos genes mostrou que *sat* foi o gene mais frequente, encontrado em 95 cepas (34,2%), seguido por *vat* (79 cepas/ 28,4%), *pic* (23 cepas/ 8,3%), *tsh* (13 cepas/ 4,7%), *espP* (5 cepas/ 1,8%), *espl*, *eatA*, *sepA* e *sigA* (3 cepas/ 1,1% cada), *espC* (2 cepas/ 0,7%) e *pet* (1 cepa/ 0,4%) (Figura 7). O gene *epeA* não foi encontrado em nenhuma das cepas.

Das 170 cepas SPATE+, 124 (72,9%) carregam apenas um dos genes pesquisados, enquanto o restante apresenta diferentes perfis de associações desses genes (Tabela 10).

Tabela 10 – Perfil genético das cepas analisadas quanto a presença de genes que codificam SPATES.

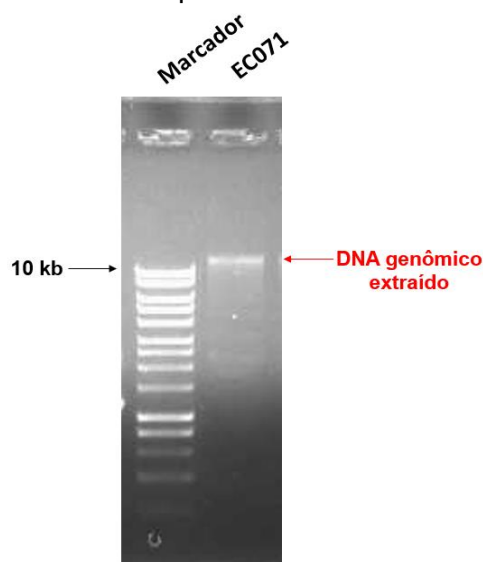
Genes	Cepas
<i>pet/pic/sepA/sat</i>	1
<i>pic/sat/vat</i>	11
<i>espl/pic/sepA</i>	1
<i>sat/vat</i>	18
<i>pic/vat</i>	10
<i>tsh/vat</i>	3
<i>sepA/sat</i>	1
<i>sigA/sat</i>	1
<i>sat</i>	63
<i>vat</i>	37
<i>tsh</i>	10
<i>espP</i>	5
<i>eatA</i>	3
<i>espC</i>	2
<i>espl</i>	2
<i>sigA</i>	2
SPATE-	108
Total:	278

4.2 Caracterização da cepa EC071

4.2.1 Sequenciamento completo no genoma da cepa EC071

A Figura 8 apresenta a análise eletroforética do DNA genômico extraído da cepa EC071, apresentando a concentração de 18,8 ng/μL. Em seguida o material foi enviado para o Setor MicrobesNG da University of Birmingham (Reino Unido) para o sequenciamento. Os dados do sequenciamento foram fornecidos nos formatos fastq, fasta e GenBank (gbk), possibilitando as análises de bioinformática. A Tabela 11 indica os parâmetros de qualidade do sequenciamento obtido.

Figura 8 – DNA genômico extraído da cepa EC071.



Análise da extração de DNA genômico da cepa EC071. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose (0,7%) corado com *Unisafe dye*® (Uniscience). Após a corrida, os géis foram expostos à luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem. Marcador de peso molecular utilizado: *HyperLadder*™ 1Kb (Bioline).

Tabela 11 - Parâmetros de qualidade do sequenciamento completo do genoma da EC071.

Características avaliadas	
Tamanho (pb)	5271699
<i>Contigs</i>	262
Genes	5139
N50 ¹	86427
N75 ²	42340
L50 ³	19
L75	40
Conteúdo G+C (%)	50,53
Cobertura	141x

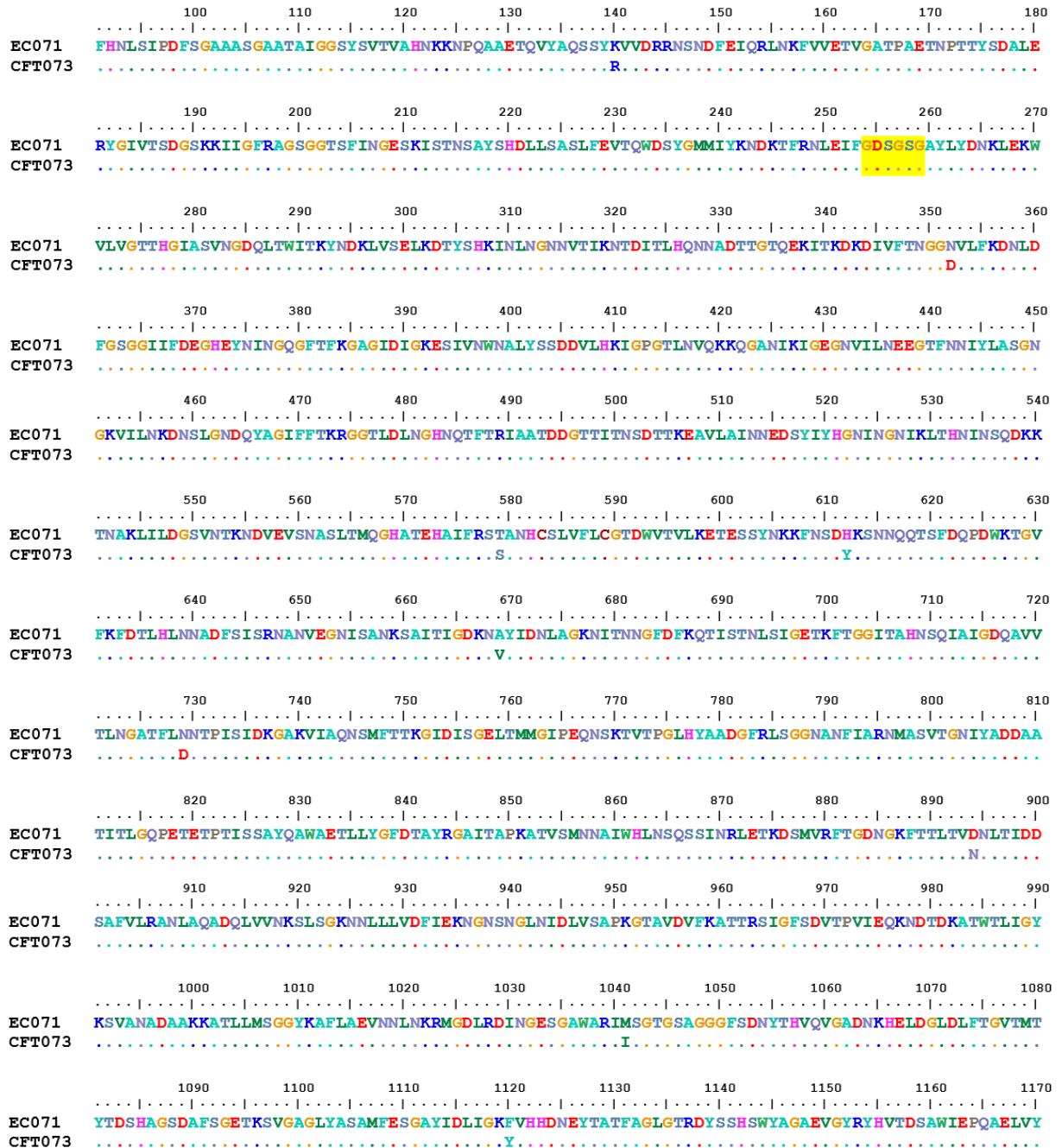
¹Tamanho em pares de bases (pb) na qual os *contigs* com este ou maior tamanho incluem metade do

total de bases;²Tamanho em pares de bases (pb) na qual os *contigs* com este ou maior tamanho incluem três quartos do total de bases ³Número de *contigs* que são maiores ou iguais ao tamanho N50;

⁴Número de *contigs* que são maiores ou iguais ao tamanho N75.

Foi realizado o alinhamento completo entre os genes *sat* da cepa EC071 e da cepa protótipo de UPEC CFT 073 (número de acesso no GenBank: AF289092.1) através da plataforma BLAST e a análise mostrou que o gene *sat* da cepa EC071 tem 99% de similaridade com o da UPEC CFT073. A sequência predita de aminoácidos do gene *sat* da EC071 foi obtida no software Bioedit e o alinhamento completo entre esta sequência e a sequência da proteína Sat da UPEC CFT073 (número de acesso no GenBank: AAG30168.1) foi realizado na plataforma Blast, indicando a identidade entre as sequências de 99%. Ainda, este alinhamento identificou nove trocas de aminoácidos entre as duas sequências e que o motivo de serino protease da proteína predita para a cepa EC071 está preservado, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Alinhamento entre as seqüências preditas de aminoácidos dos genes *sat* da EC071



e CFT-073.

Alinhamento completo entre a seqüência predita de aminoácidos do gene *sat* da cepa EC071 e a seqüência de aminoácidos da proteína Sat produzida pela cepa CFT073 (número de acesso no GenBank: AAG30168.1). O alinhamento foi realizado com o auxílio do software BioEdit (versão 7.2.5) e nove trocas de aminoácidos foram identificadas entre as seqüências, indicadas na linha referente à seqüência de aminoácidos da cepa CFT073. Em amarelo, destaca-se a região correspondente ao motivo de serinoprotease íntegro, idêntico entre as duas cepas.

A ausência dos outros genes que codificam SPATEs caracterizados até o momento também foi confirmada através do alinhamento entre as respectivas sequências de referência de cada gene e o genoma da cepa de trabalho através da plataforma Blast (Tabela 12).

Tabela 12 – Pesquisa de genes que codificam SPATEs no genoma da cepa EC071 através da plataforma BLAST.

Gene	Sequência de Referência	Cepa de Referência	EC071
<i>eatA</i>	AY163491	<i>E. coli</i> H10407	-
<i>epeA</i>	AY258503.2	<i>E. coli</i> O113:H21 EH41, plasmídeo pO113	-
<i>espC</i>	AF297061	<i>E. coli</i> E2348/69	-
<i>espl</i>	AJ278144.1	<i>E. coli</i> O91:H- 4797/97	-
<i>espP</i>	X97542.1	<i>E. coli</i> EDL933	-
<i>sigA</i>	AF200692.2	<i>S. flexneri</i> 2a	-
<i>pic</i>	NC_017626.1	<i>E. coli</i> 042	-
<i>sepA</i>	CP037924.1	<i>S. flexneri</i> 5a cepa M90T, plasmídeo pWR100	-
<i>tsh</i>	NC_009837.1	<i>E. coli</i> O1:K1:H7 APEC O1, plasmídeo pAPEC-O1-ColBM	-
<i>vat</i>	AE014075.1	<i>E. coli</i> O6:K2:H1 CFT073	-
<i>pet</i>	NC_017627.1	<i>E. coli</i> 042, plasmídeo pAA	-
<i>tagB</i>	MH899681.1	<i>E. coli</i> cepa QT598	-
<i>tagC</i>	MH899681.1	<i>E. coli</i> cepa QT598	-
<i>sha</i>	MH899684.1	<i>E. coli</i> strain QT598, plasmídeo Sha	-

Quanto aos genes relacionados à virulência intrínseca das ExPEC, a análise do genoma da EC071 utilizando a plataforma Blast mostrou que a cepa EC071 é classificada como EXPEC⁺, uma vez que ela apresenta os operons *pap*, *afa* e *dra* (Tabela 13). Em relação à presença/ausência de genes de resistência à ação bactericida do soro, realizada com as sequências de referência presentes no banco ecoli VF collection e com o auxílio da plataforma Blast, nota-se a presença dos genes *nlpI* e *prc* e alguns genes que codificam proteínas de membrana externa (OMPs). Ainda, nota-se também a presença de alguns genes integrantes de operons de diferentes grupos de cápsula. No entanto, estes mesmos operons não estão completos, sugerindo que nenhum tipo de cápsula é produzido por esta cepa (Tabela 14).

Tabela 13 – Pesquisa de genes relacionados à virulência intrínseca das ExPEC no genoma da cepa EC071 através da plataforma Blast.

Gene	Sequência de Referência - NCBI	Cepa de Referência	EC071
<i>kpsM</i>			-
<i>kpsT</i>			-
<i>iutA</i>			-
<i>iucD</i>	AE014075.1	<i>E. coli</i> CFT073	-
<i>focAICDFGH</i>			-
<i>sfaADEFSGH</i>			-
<i>papIBAHCDJKEFG</i>			+
<i>afaABCDE</i>	FM955458.1	<i>E. coli</i> FV9863	+
<i>draABCDE</i>	AF329316.1	<i>E. coli</i> IH11128	+

Tabela 14 – Fatores de virulência relacionados a mecanismos de resistência ao soro pesquisados no genoma da cepa EC071, utilizando as sequências de referência do banco ecoli VF collection e com o auxílio da plataforma Blast.

Fatores de virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Cápsula polissacarídica do grupo 2	NC_017631.1	<i>E. coli</i> ABU 83972	<i>kpsF-II</i>	ECABU_c33430	+
			<i>kpsE-II</i>	ECABU_c33440	+
			<i>kpsD-II</i>	ECABU_c33450	+
			<i>kpsU-II</i>	ECABU_c33460	+
			<i>kpsC-II</i>	ECABU_c33470	+
			<i>kpsS-II</i>	ECABU_c33480	+
			<i>kpsM-II-K5</i>	ECABU_c33560	-
			<i>kpsT-II-K5</i>	ECABU_c33550	-
	AE014075.1	<i>E. coli</i> O6:K2:H1 CFT073	<i>kpsM-K2</i>	c3698	-
			<i>kpsT-K2</i>	c3697	-
			<i>neuS</i>	UTI89_C3368	-
			<i>neuE</i>	UTI89_C3369	-
			<i>neuC</i>	UTI89_C3370	-
			<i>neuA</i>	UTI89_C3371	-
NC_007946.1	<i>E. coli</i> O18:K1:H7 UTI89	<i>neuB</i>	UTI89_C3372	-	
		<i>neuD</i>	UTI89_C3373	-	
		<i>kpsT-K1</i>	UTI89_C3374	-	
		<i>kpsM-K1</i>	UTI89_C3375	-	
		<i>kpsC'-K5</i>	ECP_3024	+	
		<i>kpsS-K10</i>	ECP_3027	+	
Cápsula polissacarídica K-15 (constituída por elementos dos grupos 2 e 3)	NC_008253.1	<i>E. coli</i> O6:K15:H31 536	<i>kpsC-K10</i>	ECP_3028	-
			<i>kpsT-K15</i>	ECP_3035	-
			<i>kpsM-K15</i>	ECP_3036	-

Tabela 14 (cont.) – Fatores de virulência relacionados a mecanismos de resistência ao soro pesquisados no genoma da cepa EC071, utilizando as sequências de referência do banco ecoli VF collection e com o auxílio da plataforma Blast.

Fatores de virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC-071
Cápsula polissacarídica do grupo 3	NZ_JDRV01000043.1	<i>E. coli</i> MS499	<i>kpsD-III</i>	AK99_RS0104360	-
			<i>kpsM-III</i>	AK99_RS0104355	-
			<i>kpsT-III</i>	AK99_RS0104350	-
			<i>kpsE-III</i>	AK99_RS0104345	-
			<i>kpsC-III</i>	AK99_RS0104270	-
			<i>kpsS-III</i>	AK99_RS0104265	+
Cápsula polissacarídica do grupo 4	NZ_CP009166.1	<i>E. coli</i> O70:H32 1303	<i>gfcA</i>	EC1303_c10070	-
			<i>gfcB</i>	EC1303_c10060	-
			<i>gfcC</i>	EC1303_c10050	-
			<i>gfcD</i>	EC1303_c10040	-
			<i>gfcE</i>	EC1303_c10030	-
			<i>etp</i>	EC1303_c10020	-
			<i>etk</i>	EC1303_c10010	-
Proteínas de membrana externa	X74278.1	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	<i>ompP</i>	-	-
	U00096.3		<i>ompX (ompP)</i>	b0814	+
	NC_008563.1	<i>E. coli</i> O1:K1:H7 APEC O1	<i>ompTc</i>	APECO1_1482	+
	NC_007675.1	<i>E. coli</i> O2 APEC A2363, plasmídeo pAPEC-O2-CoIV	<i>ompTp</i>	O2CoIV26	+
Proteases	CP000244.1	<i>E. coli</i> O157:H7 EDL933	<i>stcE</i>	UTI89_P030	-
	NC_000913.3	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	<i>prc</i>	B1830	+
	CU928161.2	<i>E. coli</i> O45:K1:H7 S88	<i>nlpl</i>	ECS88_3547	+
Protectinas	NC_009837.1	<i>E. coli</i> O1:K1:H7 APEC O1, plasmídeo pAPEC-O1-CoIBM	<i>bor/ iss</i>	APECO1_O1CoBM146	-
	J01769.1	<i>E. coli</i> plasmídeo R100	<i>traT</i>	J01769	-

Finalmente, as análises realizadas nas plataformas Center for *Genomic Epidemiology* e *ClermontTyping* determinaram que a EC071 pertence ao sorotipo O1:H7, ao ST 59 e ao filogrupo F (Anexo B). Através da ferramenta PlasmidFinder, verificou-se também a presença de cinco diferentes origens de replicação (Anexo B), sugerindo a presença de pelo menos cinco plasmídeos na EC071. É importante notar que nenhuma dessas origens está no mesmo *contig* que o gene *sat*.

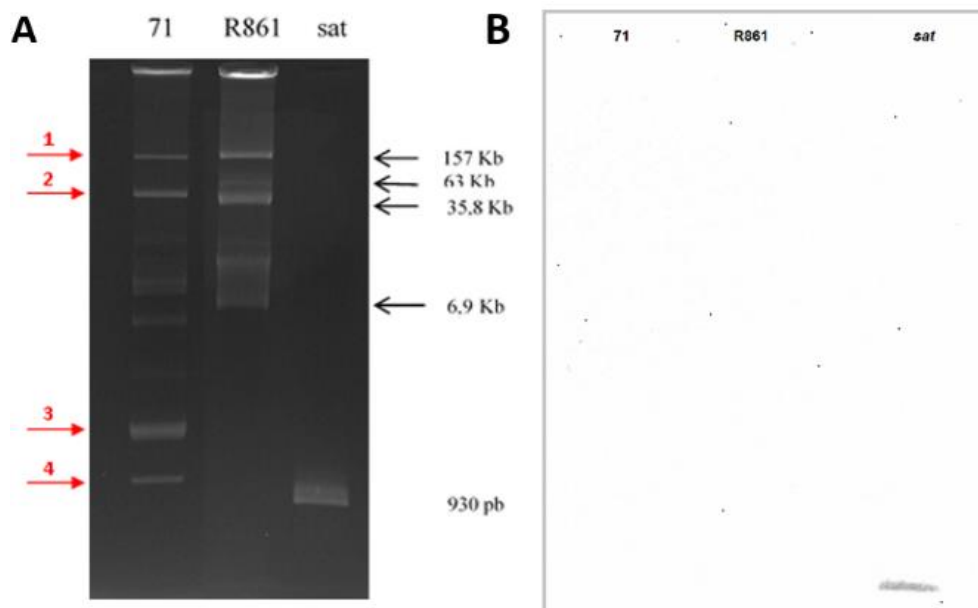
Uma análise mais abrangente dos fatores de virulência presentes no genoma da EC071 também foi realizada em comparação com o banco de dados do *ecoliVF* collection e com o auxílio da plataforma Blast, conforme apresentado no Anexo C. A análise do *contig* obtido que alberga o gene *sat* mostrou a ausência de sequências de inserção nas regiões flangeadoras do gene (Anexo D). Finalmente, o alinhamento contra as sequências referentes às ilhas de patogenicidade da cepa UPEC CFT073 indicou que tanto a PAI I quanto a PAI II (número de acesso no GenBank NC_004431.1, regiões 3406225-3448724 e 4913367-49633366, respectivamente) não estão presentes no genoma da cepa EC071 (Anexo D).

O genoma completo da cepa EC071 foi submetido ao GenBank para depósito (BioProject ID: PRJNA701470; BioSample accession: SAMN17882780; aguardando curadoria da sequência para disponibilização da sequência).

4.2.2 Determinação do contexto genético de *sat* na EC071

O gel resultante da análise da extração plasmideal pode ser observado na Figura 10A. Conforme indicado pelas setas vermelhas, a cepa EC071 possui quatro bandas correspondentes a possíveis plasmídeos de diferentes tamanhos aproximados: 140 kb, 52,5 kb, 5 kb e 2,5 kb. O resultado da hibridização desses plasmídeos com a sonda correspondente a um fragmento do gene *sat* mostrou que o gene pesquisado não está em algum desses plasmídeos (Figura 10B). Entretanto, a extração plasmideal apresentou pouca contaminação de DNA cromossômico (Figura 10A) e não houve reconhecimento desse material pela sonda genética para o gene *sat* no respectivo *Southern blot*.

Figura 10 – Determinação do contexto genético de *sat* na cepa EC071 através da análise do perfil plasmidial da cepa.



(A) Extração plasmidial das cepas EC071 e R861 (NCTC) pelo método de Birnboim e Doly (1979). As setas vermelhas indicam bandas de possíveis plasmídeos albergados pela cepa EC071 de aproximadamente 140 kb, 52,5 kb, 5kb e 2,5 kb. Após a corrida eletroforética, o gel de agarose (0,7%) foi corado com *Unisafe dye*® (Uniscience) e exposto à luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem. (B) Membrana resultante do *Southern blot* submetida à hibridização DNA-DNA com o fragmento de 930 pb correspondente ao gene *sat*, indicando que ele não está presente em algum dos plasmídeos albergados pela cepa EC071. Imagem obtida com o fotodocumentador Alliance (Uvitec).

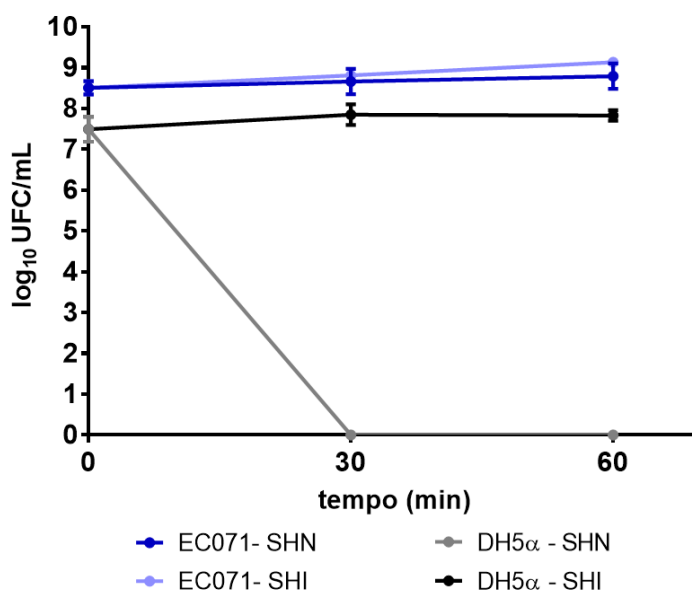
Esses achados estão em concordância com os resultados observados na análise do genoma completo quanto à presença de plasmídeos. Dessa forma, considerando o resultado obtido no *Southern blot* e o fato das origens de replicação encontradas pelo PlasmidFinder estarem em *contigs* diferentes daquele onde está o gene *sat*, sugere-se que, na cepa EC071, o gene *sat* seja cromossômico.

4.2.3 Resistência da cepa EC071 à ação bactericida do soro humano

A resistência à ação bactericida do soro da EC071 foi avaliada e o comportamento desta cepa em contato direto com soro humano normal a 50% está representado na Figura 11. É possível observar que as contagens de unidades formadoras de colônia são iguais nos testes com soro humano normal (SHN) e soro humano inativado pelo calor (SHI), e ambas correspondem a quantidade de bactérias presentes no inóculo inicial. Dessa forma, conclui-se que a EC071 é capaz de resistir à ação do sistema complemento integral presente no SHN.

Em comparação, a cepa DH5 α não resistiu à ação do sistema complemento presente no NHS e foi completamente eliminada durante o teste (Figura 11). Tal resultado era esperado, uma vez que esta cepa não possui fatores de virulência relacionados à resistência ao soro. Dessa forma, ela foi utilizada no teste como controle de morte, demonstrando a integridade das proteínas do sistema complemento presentes no NHS.

Figura 11 - Resistência da cepa EC071 à ação bactericida do soro.



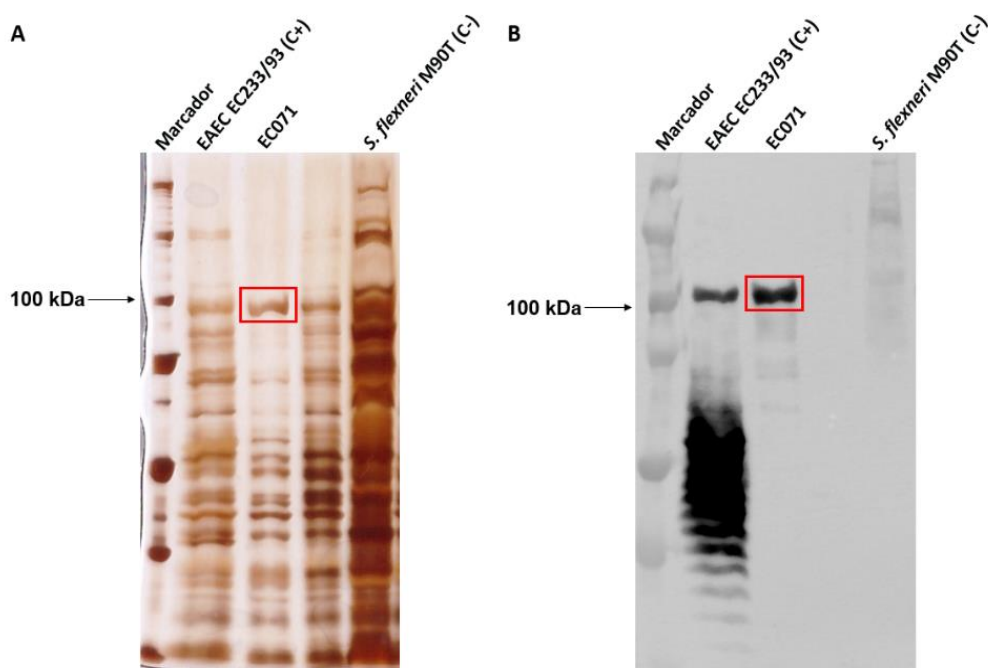
Contagens de UFC/mL em ágar MacConkey obtidas para as cepas EC071 e DH5 α (controle de morte), em relação ao seu inóculo inicial (sem contato com soro, correspondente ao tempo zero) e após 30 e 60 min de contato com 50% de soro humano normal (SHN) ou soro humano inativado pelo calor (SHI).

4.2.4 Verificação da produção de Sat pela EC071

As proteínas do sobrenadante de cultura da cepa EC071 foram precipitadas com ácido tricloroacético e analisadas por SDS-PAGE e imunodeteção com um soro específico anti-Sat.

A Figura 12A apresenta um dos géis de poliacrilamida resultante da análise após coloração por nitrato de prata. Observa-se no destaque a presença de um componente proteico com massa molecular de aproximadamente 100 kDa na canaleta correspondente ao precipitado da EC071. Na membrana resultante da imunodeteção, a mesma banda foi reconhecida pelo anticorpo primário, indicando que Sat está presente no sobrenadante de cultura da cepa EC-071 (Figura 12B).

Figura 12 – Verificação da produção de Sat pela cepa EC071.

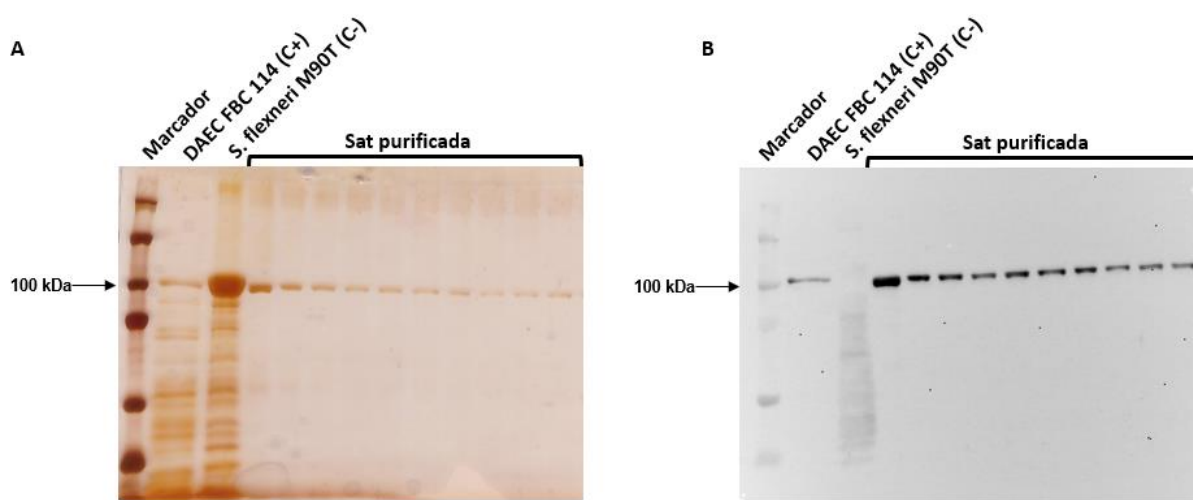


(A) Proteínas precipitadas do sobrenadante de cultura das cepas EC233/93 (Sat+), EC071 (Sat+) e *S. flexneri* M90T (Sat-) submetidas à análise eletroforética por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 8%) corado por nitrato de prata; Marcador: *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards* (BioRad). (B) Membrana de nitrocelulose resultante da transferência das referidas proteínas após análise eletroforética. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção de Sat foi realizada com o soro específico anti-Sat (1:500) e soro de coelho anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o kit *SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da deteção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). Os quadrados vermelhos indicam a presença de um componente proteico de massa molecular de aproximadamente 100 kDa, correspondente à Sat (107 kDa).

4.3 Purificação de Sat a partir do sobrenadante de cultura da EC071

A purificação de Sat foi realizada em coluna de troca aniônica. A Figura 13 representa a análise por SDS-PAGE e imunodeteção com um soro específico anti-Sat das frações obtidas no procedimento.

Figura 13 – Purificação de Sat a partir do sobrenadante de cultura da cepa EC071.



(A) Gel de poliacrilamida (8%) resultante da análise eletroforética do conteúdo proteico das frações obtidas na purificação de Sat em coluna de troca iônica, após coloração por nitrato de prata. Marcador: *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards* (BioRad). (B) Membrana de nitrocelulose resultante da transferência do referido conteúdo proteico após análise eletroforética. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção de Sat foi realizada com o soro específico anti-Sat (1:500) e soro de coelho anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o kit *SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). A presença de componentes proteicos únicos nas canaletas correspondentes a cada fração obtida na purificação indicam a presença de Sat purificada.

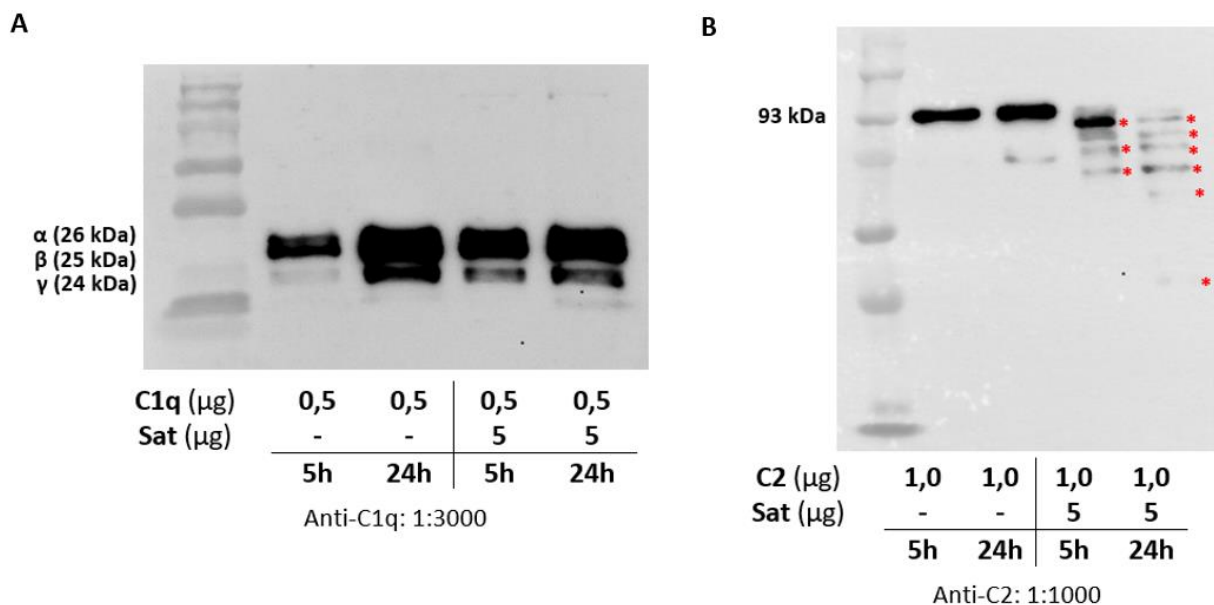
O gel corado por nitrato de prata (Figura 13A) indica a presença de um componente proteico com massa molecular de aproximadamente 100 kDa nas frações analisadas. A mesma banda foi reconhecida pelo anticorpo primário na imunodeteção (Figura 13B), confirmando assim a presença de Sat nas frações. Ainda, a análise por espectrometria de massas das frações obtidas confirmou a identidade da proteína obtida (Anexo E). Dessa forma, conclui-se que a purificação de Sat na sua forma nativa foi bem sucedida. As frações contendo Sat purificada foram reunidas em um único tubo e a mistura resultante foi quantificada. Dessa forma, determinou-se a concentração de Sat nessa solução em 0,227 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.4 Ensaios de clivagem das proteínas do complemento por Sat purificada

4.4.1 Ensaios proteolíticos simples

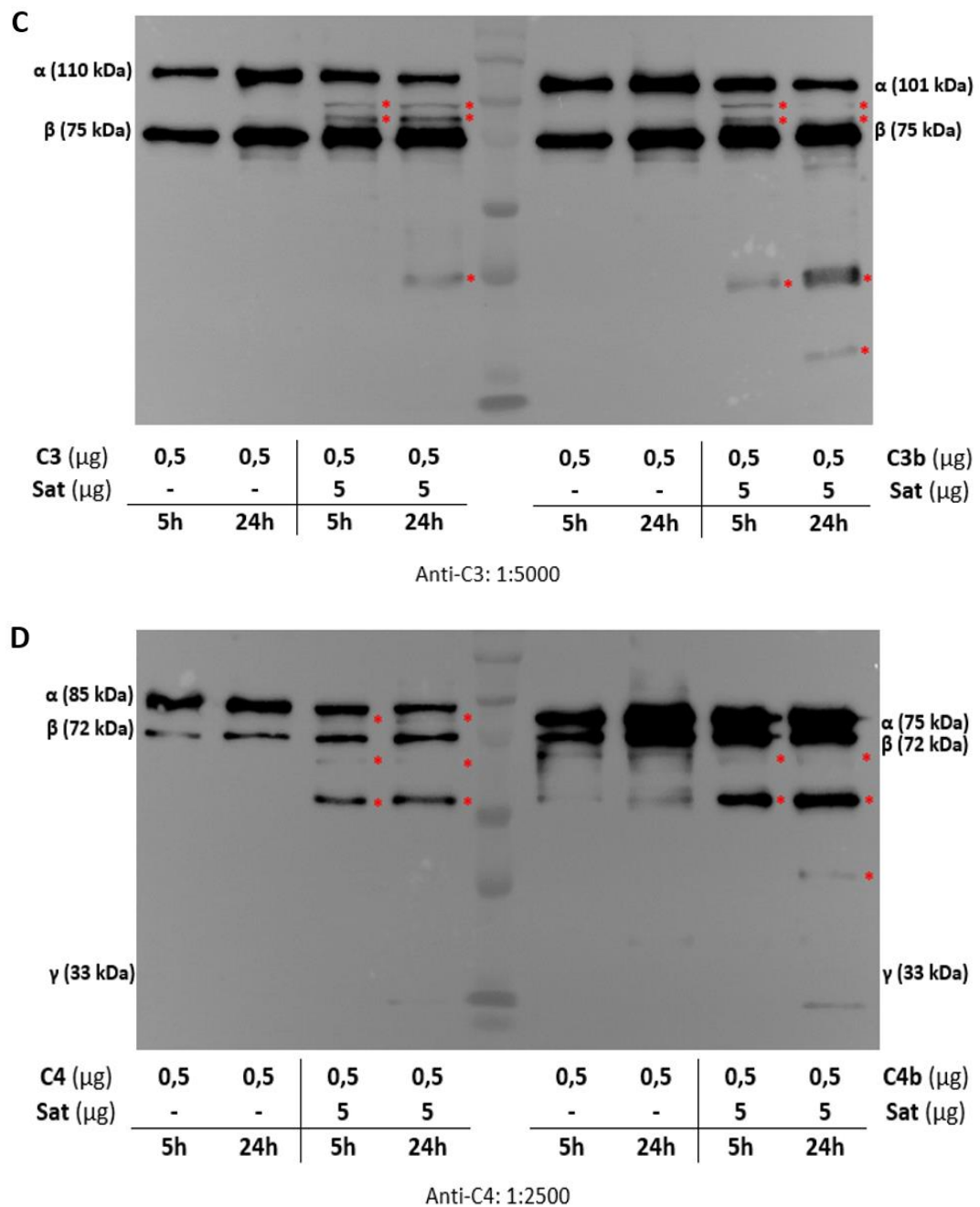
Os ensaios proteolíticos simples foram realizados com o propósito de verificar quais proteínas do sistema complemento seriam possíveis substratos de Sat. Para tal, 5,0 µg de Sat foram utilizados para observar possíveis clivagens. Os resultados desses ensaios podem ser observados na Figura 14.

Figura 14 - Ensaios proteolíticos simples.



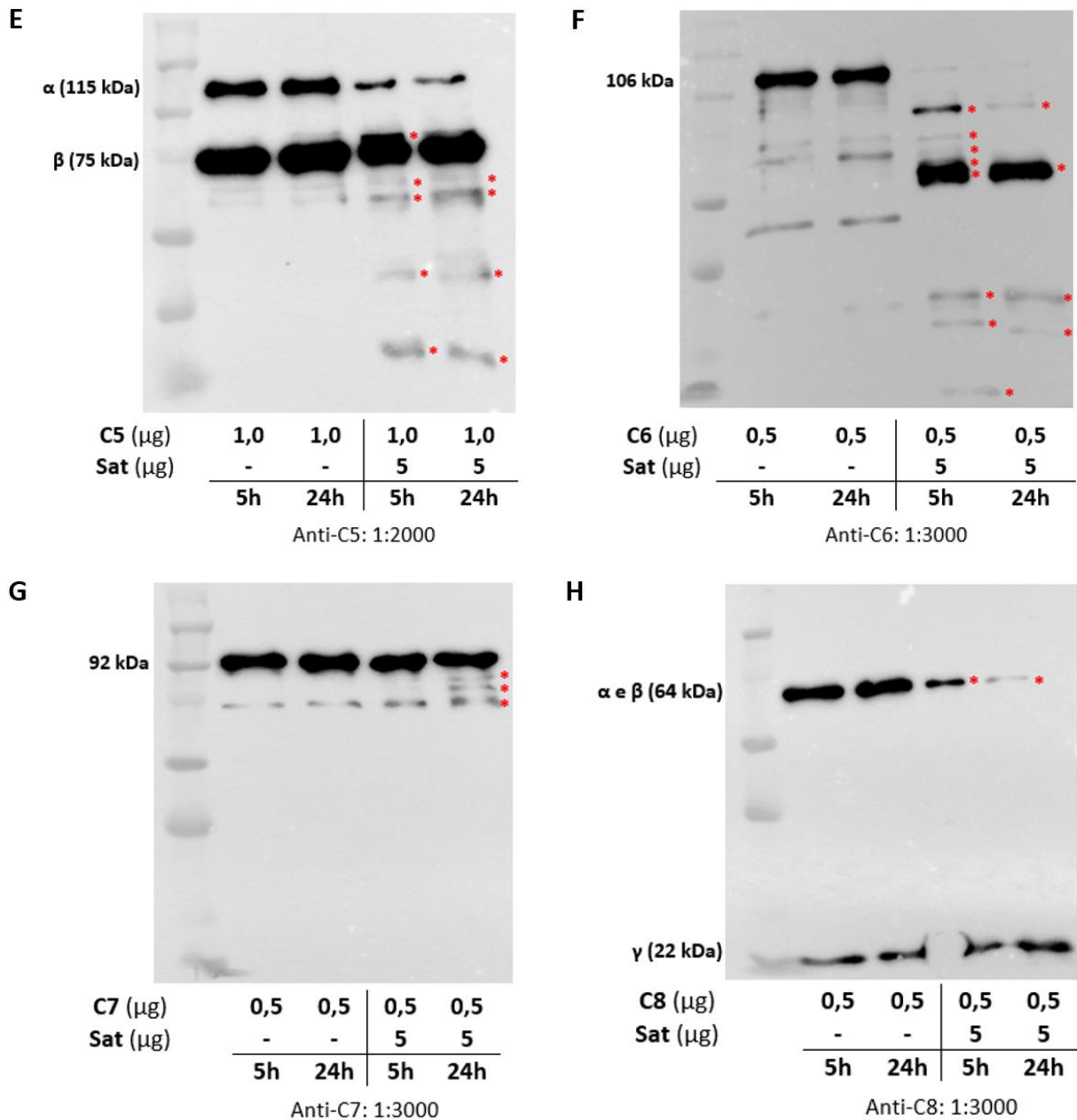
Membranas de nitrocelulose resultantes da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos simples, após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (A) C1q incubada com Sat; (B) C2 incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodetecção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado em cada imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o kit *SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Figura 14 (cont.) - Ensaio proteolítico simples.

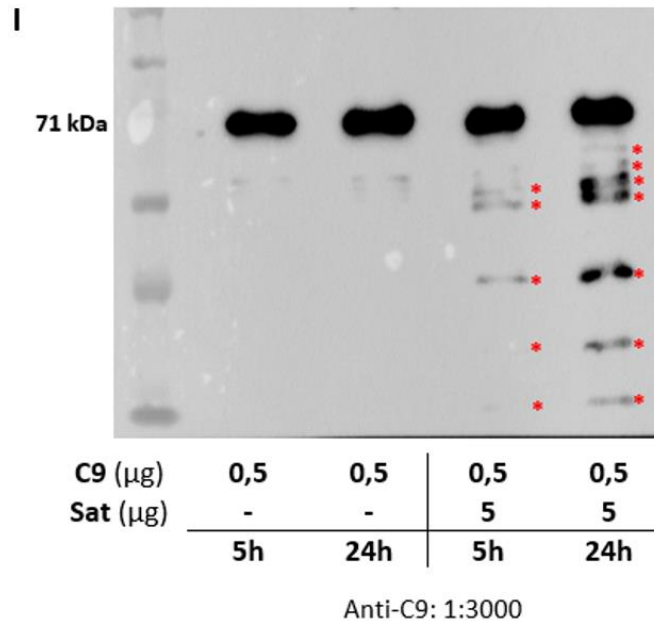


Membranas de nitrocelulose resultantes da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos simples após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (C) C3 e C3b incubadas com Sat; (D) C4 e C4b x Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado em cada imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Figura 14 (cont.) - Ensaios proteolíticos simples.



Membranas de nitrocelulose resultantes da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos simples após análise eletroforética em gel de poliácridamida (10%). (E) C5 incubada com Sat; (F) C6 incubada com Sat; (G) C7 incubada com Sat; (H) C8 incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado em cada imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Figura 14 (cont.) - Ensaios proteolíticos simples.

Membrana de nitrocelulose resultante da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos simples após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (I) C9 incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado na imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Com exceção de C1q, todas as proteínas do complemento avaliadas constituíram substratos para a atividade proteolítica de Sat. C2, C5 (cadeia α), C6 e C8 foram clivadas com maior intensidade, apresentando uma redução quase que completa das cadeias oriundas da desnaturação de sua estrutura. Ainda, é possível observar que as clivagens presentes nos testes com C3b e C4b foram mais intensas do que as observadas nos testes com C3 e C4. Este resultado sugere que a perda fisiológica de cerca de 10 kDa nas cadeias α de C3 e C4 (correspondentes às formas C3a e C4a, respectivamente) favorece a exposição do sítio de clivagem dessas moléculas por Sat, remanescentes em suas formas ativadas (C3b e C4b).

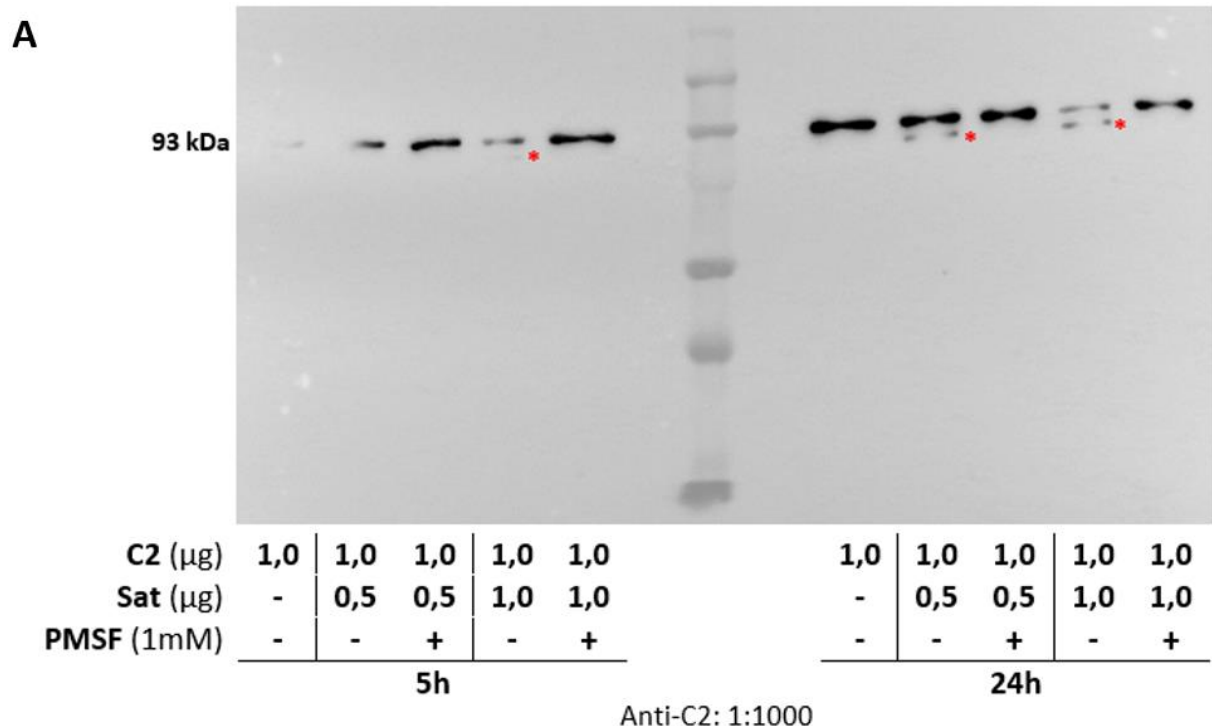
Finalmente, produtos de degradação podem ser observados nas linhas relativas aos tubos controle de C2, C3/C3b, C4b, C5, C6, C7 e C9. Considerando que o perfil dessas degradações é diferente do perfil apresentando nos tubos testes,

sugere-se que estes produtos sejam gerados a partir da degradação espontânea das moléculas alvo em sítios diferentes daqueles utilizados na clivagem por Sat.

4.4.2 Ensaios proteolíticos com inibição

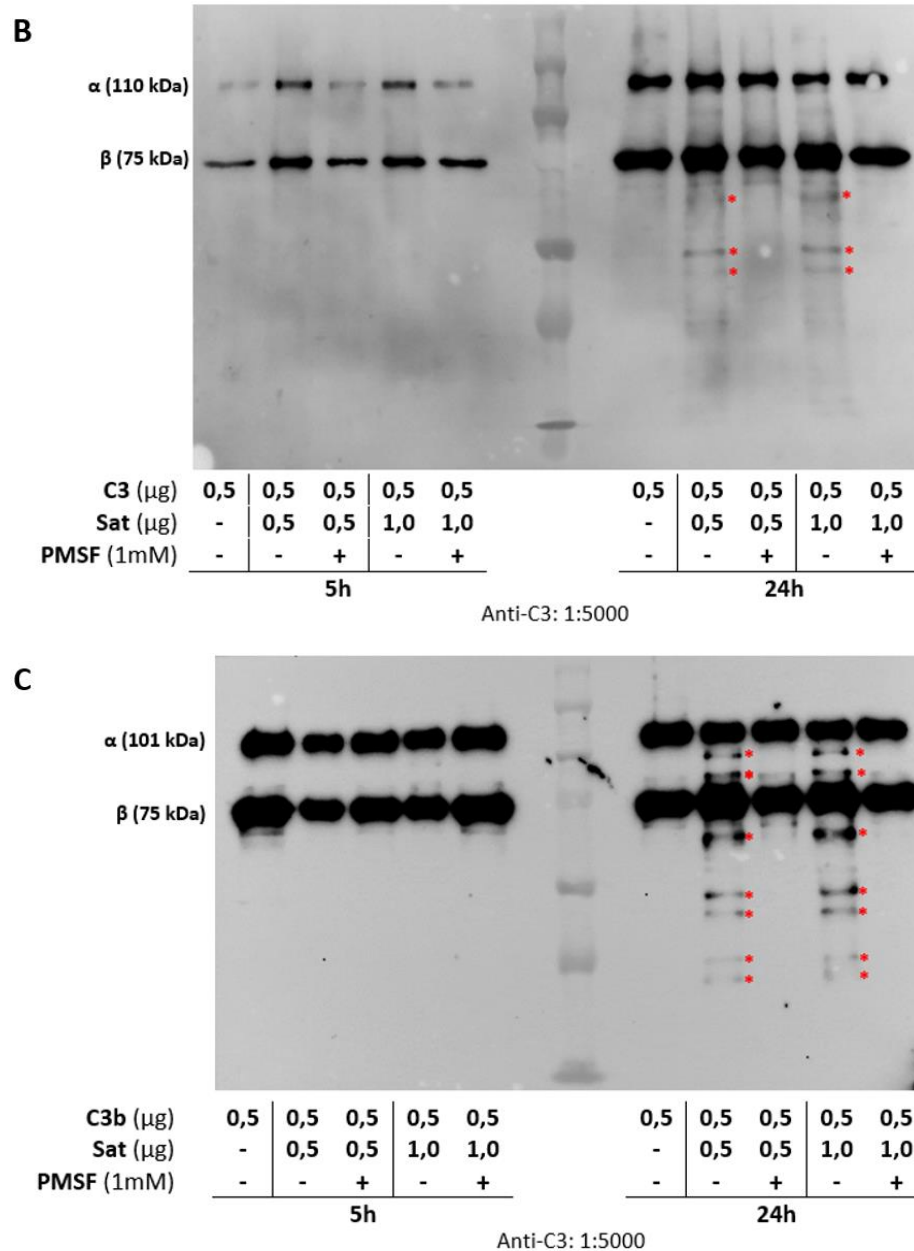
Após a identificação dos substratos de Sat que fazem parte da cascata de ativação do sistema complemento, novos ensaios proteolíticos foram realizados com quantidades menores da protease e com a presença do inibidor PMSF (1mM), de forma a determinar se a clivagem desses substratos era dependente da quantidade de Sat presente no meio e se o sítio ativo dessa serinoprotease seria o responsável pela clivagem dos substratos. A Figura 15 indica os resultados obtidos.

Figura 15 - Ensaios proteolíticos com diferentes quantidades de Sat e inibição por PMSF.



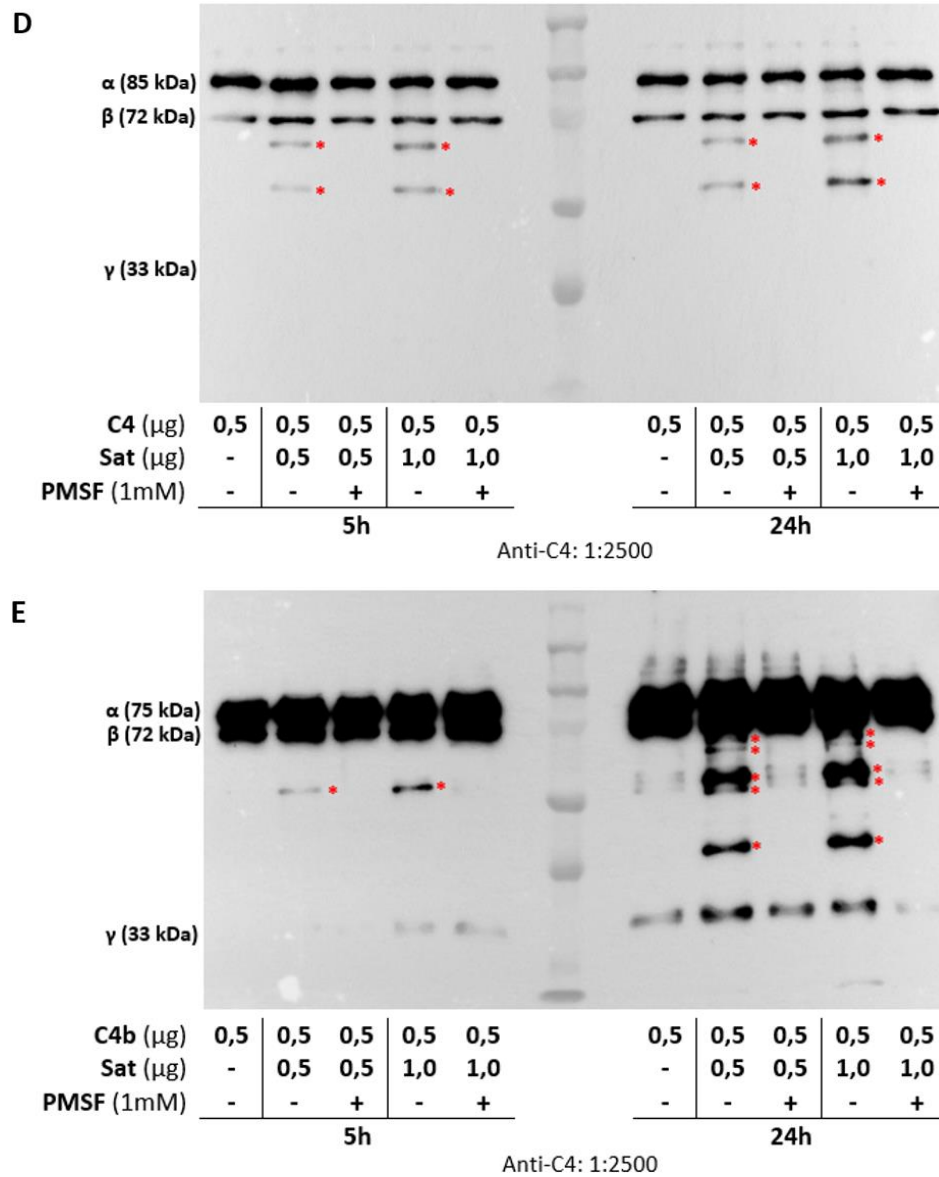
Membrana de nitrocelulose resultante da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos com inibição por PMSF (1 mM) após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (A) C2 incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado na imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Figura 15 (cont.)- Ensaios proteolíticos com diferentes quantidades de Sat e inibição por PMSF.



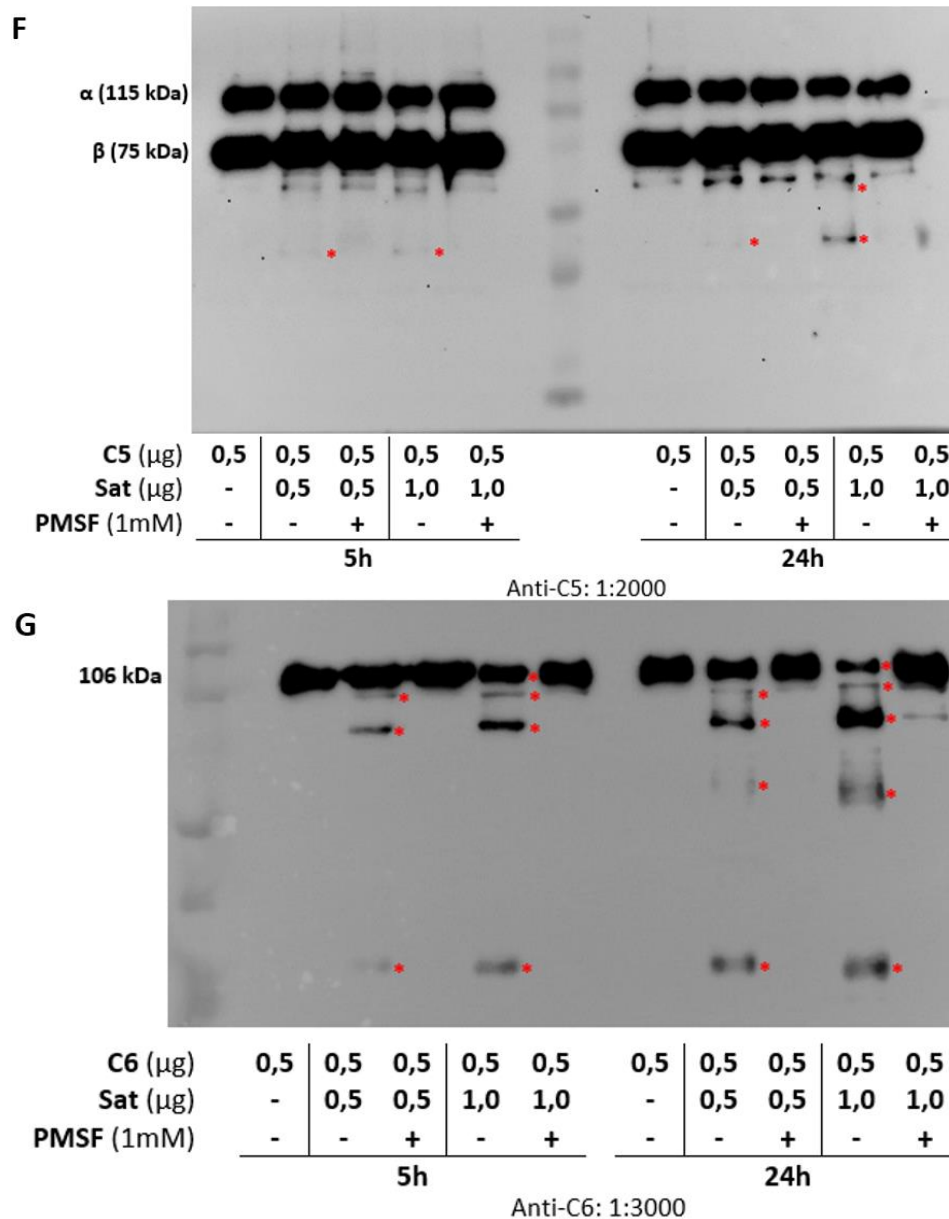
Membranas de nitrocelulose resultantes da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos com inibição por PMSF (1mM) após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (B) C3 incubada com Sat; (C) C3b incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado em cada imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Figura 15 (cont.) - Ensaio proteolítico com diferentes quantidades de Sat e inibição por PMSF.



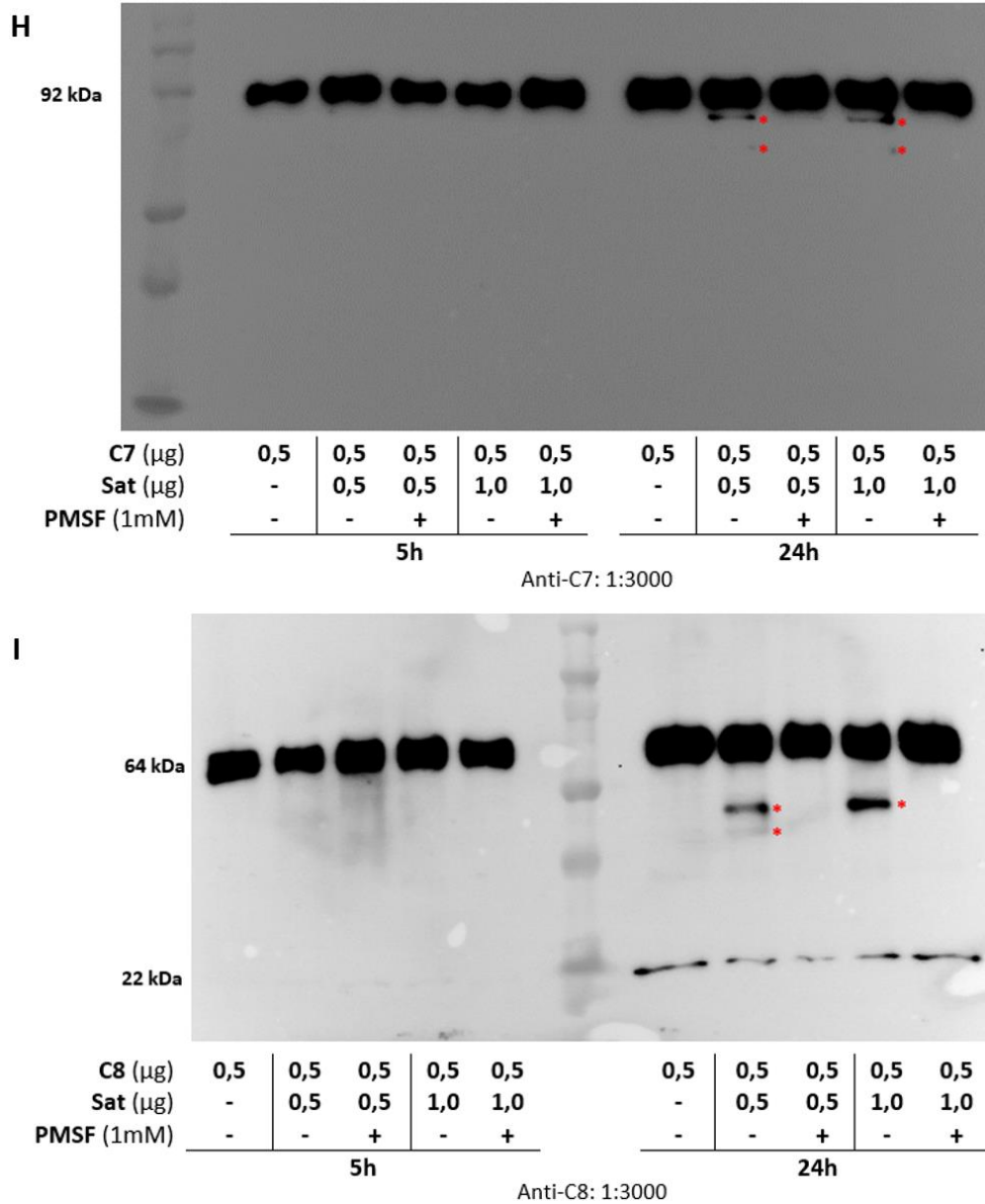
Membranas de nitrocelulose resultantes da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos com inibição por PMSF (1mM) após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (D) C4 incubada com Sat; (E) C4b incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado em cada imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Figura 15 (cont.) - Ensaio proteolítico com diferentes quantidades de Sat e inibição por PMSF.



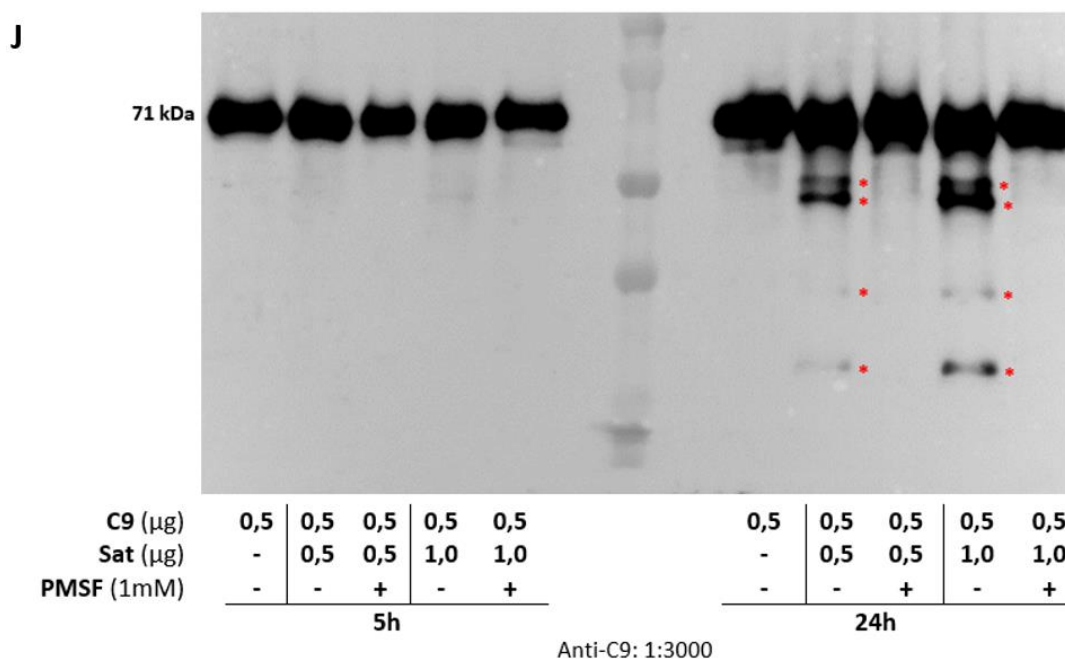
Membranas de nitrocelulose resultantes da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos com inibição por PMSF (1mM) após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (F) C5 incubada com Sat; (G) C6 incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado em cada imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Figura 15 (cont.) - Ensaio proteolítico com diferentes quantidades de Sat e inibição por PMSF.



Membranas de nitrocelulose resultantes da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos com inibição por PMSF (1mM) após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (H) C7 incubada com Sat; (I) C8 incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado em cada imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

Figura 15 (cont.) - Ensaio proteolítico com diferentes quantidades de Sat e inibição por PMSF.

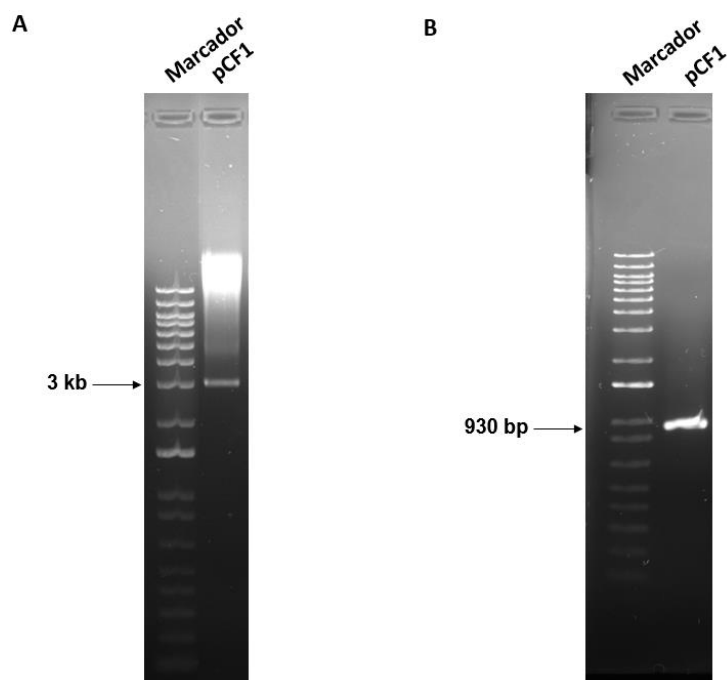


Membrana de nitrocelulose resultante da transferência do conteúdo proteico dos ensaios proteolíticos com inibição por PMSF (1mM) após análise eletroforética em gel de poliacrilamina (10%). (J) C9 incubada com Sat. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção da proteína alvo foi realizada com o soro específico (indicado na imagem) e soro de cabra anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific). Imagem resultante da detecção do sinal de quimioluminescência com o fotodocumentador Alliance (Uvitec). As massas moleculares indicadas nas Figuras correspondem às cadeias liberadas por cada proteína alvo após desnaturação. * indica a presença de produtos de clivagem das moléculas alvo.

4.5 Construções genéticas obtidas

4.5.1 Obtenção da cepa mutante em *sat* EC071::pCF2

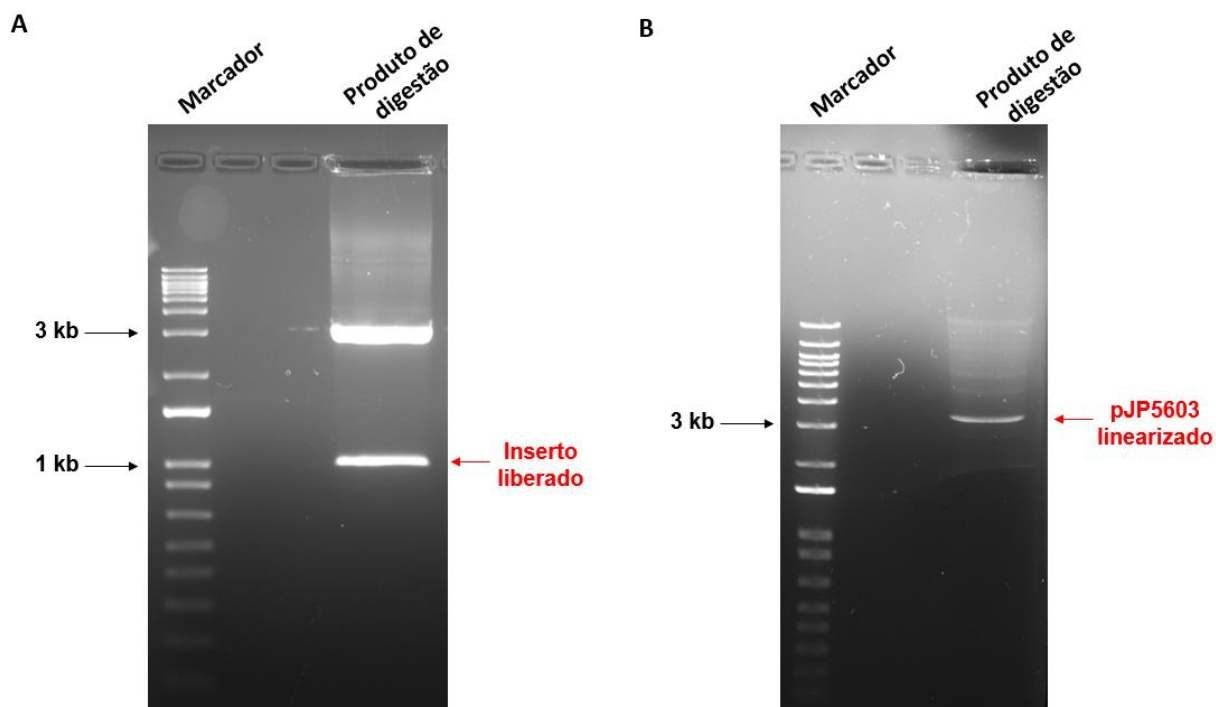
Inicialmente, um fragmento interno do gene *sat* da cepa EC071, previamente obtido por PCR, foi clonado no vetor pGEM-T easy para obtenção da construção pCF1. Após a seleção de um transformante, a clonagem foi confirmada através da extração plasmideal e detecção de um fragmento de 930 pb corresponde ao inserto clonado por PCR, conforme indicado na Figura 16.

Figura 16 – Obtenção da construção pCF1.

Géis de agarose (0,7%) resultantes da análise eletroforética da (A) extração plasmideal do transformante contendo pCF1 e do (B) produto de PCR correspondente ao fragmento do gene *sat* da EC071 clonado em pCF1. Os géis foram corados com *Unisafe dye*® (Uniscience), e após a corrida, foram expostos à luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem. Marcador de peso molecular utilizado: 1 kb plus (Invitrogen).

Após a obtenção da construção pCF1, esse plasmídeo foi digerido com a enzima *EcoRI* (Invitrogen) para obtenção do inserto correspondente ao fragmento interno do gene *sat* da cepa EC071, contendo os sítios de restrição de *EcoRI* (Invitrogen) em suas extremidades. Paralelamente, o vetor pJP5603 foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e tratado com CIP (Invitrogen), para que os mesmos fossem linearizados e suas extremidades desfosforiladas, de forma a impedir a sua recircularização. A Figura 17 mostra o resultado dessas duas digestões, onde se observa o fragmento de 930 pb liberado da digestão do pCF1 e o vetor pJP5603 linearizado (3,1 kb).

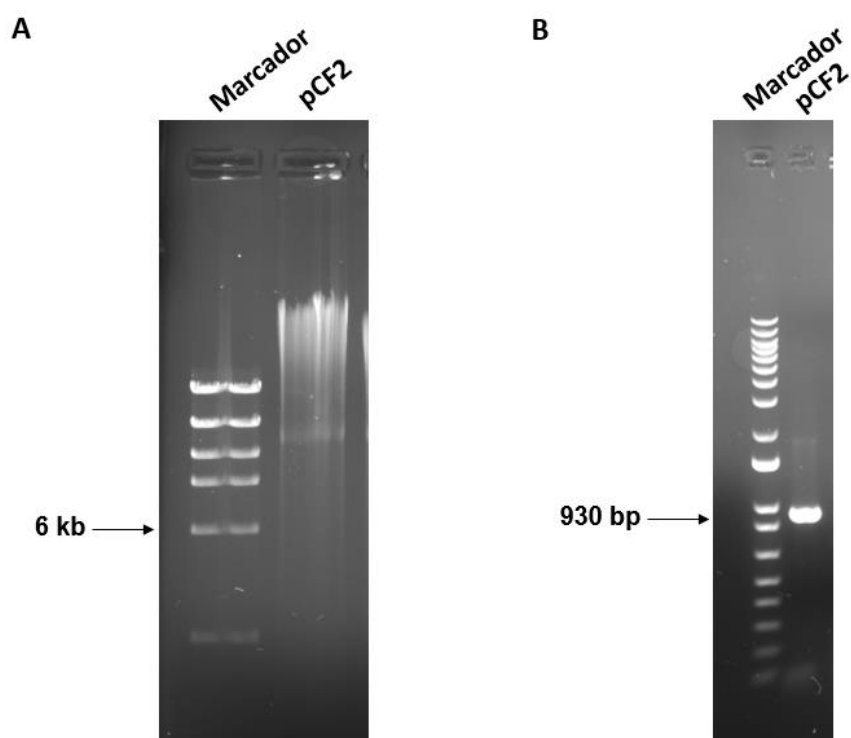
Figura 17 – Digestões enzimáticas de pCF1 e pJP5603.



Géis de agarose (0,7%) resultantes da análise eletroforética do (A) produto de digestão de pCF1 com EcoRI e do (B) produto de digestão de pJP5603 com EcoRI. Os géis foram corados com *Unisafe dye*® (Uniscience), e após a corrida, foram expostos à luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem. Marcador de peso molecular utilizado: 1 kb plus (Invitrogen).

O inserto obtido foi então ligado no vetor pJP5603 digerido, resultando na construção pCF2. A construção obtida foi então transformada na cepa S17-1(λ pir). A clonagem foi confirmada através da extração plasmideal e detecção de um fragmento de 930 corresponde ao inserto clonado por PCR, conforme indicado na Figura 18.

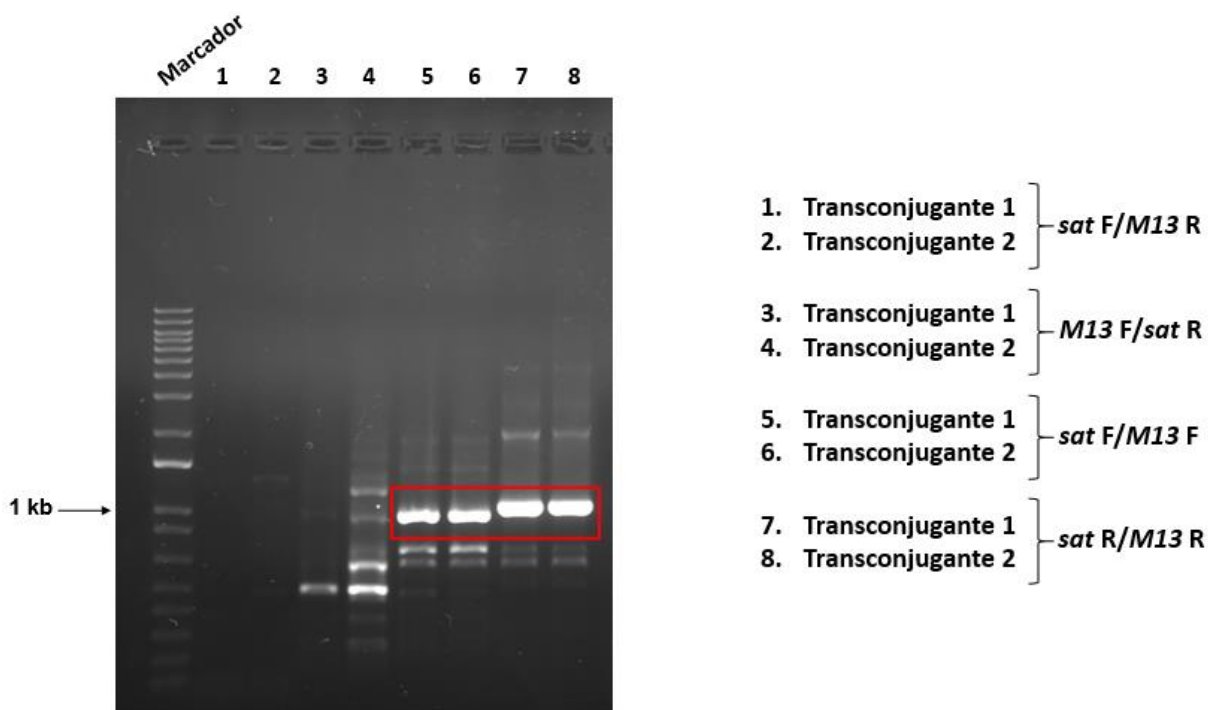
Figura 18 – Obtenção da construção pCF2.



Géis de agarose (0,7%) resultantes da análise eletroforética da (A) extração plasmideal do transformante contendo pCF2 e do (B) produto de PCR correspondente ao fragmento do gene *sat* da EC071 clonado em pCF2. Os géis foram corados com *Unisafe dye*[®] (Uniscience), e após a corrida, foram expostos à luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem. Marcador de peso molecular utilizado: 1 kb plus (Invitrogen).

Finalmente, a conjugação entre as cepas EC071 e S17-1(λ pir) resultou em uma série de transconjugantes. A fim de verificar a interrupção do gene *sat* na cepa EC071, foram realizadas reações de PCR com diferentes combinações de iniciadores *sat* e M13: *sat* F e M13 R; *sat* R e M13 F; *sat* F e M13 F; *sat* R e M13 R (Tabelas 2 e 8, respectivamente). A Figura 19 mostra o resultado dessas reações evidenciando a presença de fragmentos amplificados pela combinação de iniciadores do gene *sat* e da sequência de M13 presente apenas no vetor pJP5603. Essas amplificações mostram que houve recombinação homóloga entre o gene *sat* e o plasmídeo pCF2, levando à inserção da construção nesse sítio e consequente mutagênese de *sat*. As bandas destacadas em vermelho foram purificadas e submetidas ao sequenciamento pelo método de Sanger para confirmação da inserção de pCF2 no gene *sat*. O resultado do alinhamento entre as sequências obtidas, a sequência do gene *sat* da cepa EC071 e do vetor pJP5603 está apresentado no Anexo F.

Figura 19 – Confirmação da inserção da construção pCF2 no gene *sat* da cepa EC071.

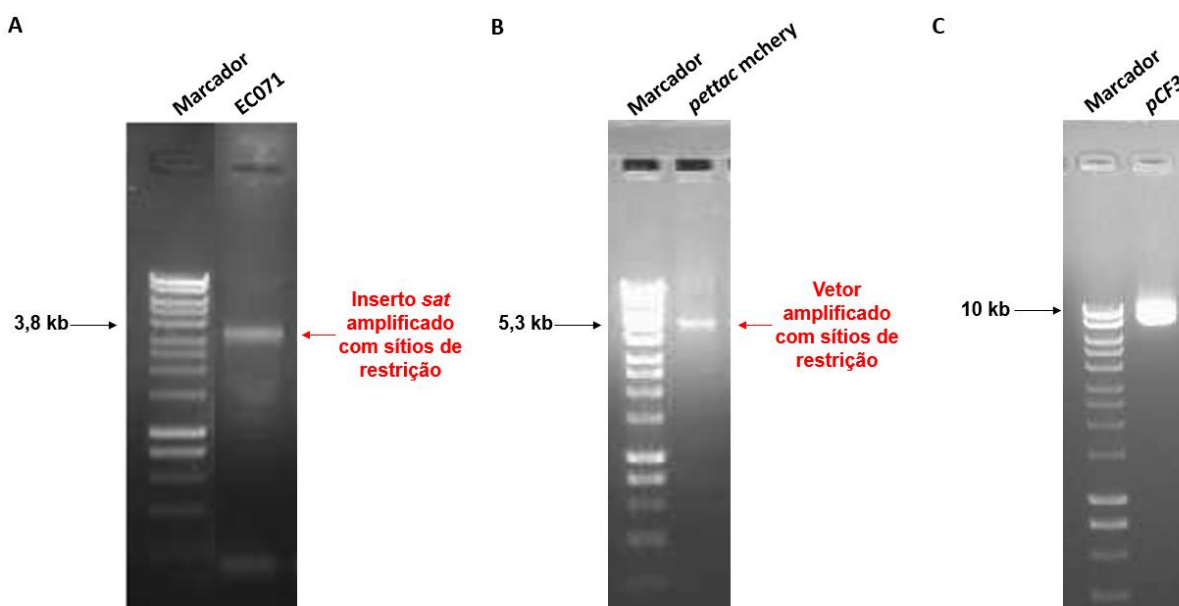


Gel de agarose (0,7%) resultante da análise eletroforética dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA dos transconjugantes 1 e 2 (canaletas ímpares e canaletas pares, respectivamente, obtidos com diferentes combinações dos primers *satNB* e *M13*. Após a corrida eletroforética os géis foram corados com *Unisafe dye®* (Uniscience) e expostos à luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem. Marcador de peso molecular: 1 kb plus (Invitrogen).

4.5.2 Obtenção das construções pCF3 e pCF4

A fim de se obter a construção pCF3, o gene *sat* da cepa EC071 e o vetor *pettac* foram completamente amplificados a partir do DNA genômico da cepa EC071 e do plasmídeo *pettac mcherry*. Após a digestão do inserto e do vetor com as enzimas apropriadas, ligação entre ambos e transformação, os transformantes foram selecionados e sequenciados para confirmação da clonagem. Os resultados obtidos durante estas etapas são apresentados na Figura 20, que mostra o produto de PCR (3,8 kb) resultante da amplificação do gene *sat* da cepa EC071, o produto de PCR resultante da amplificação do vetor *pettac* (5,3 kb) e o plasmídeo extraído do transformante que alberga a construção pCF3 (9,1 kb).

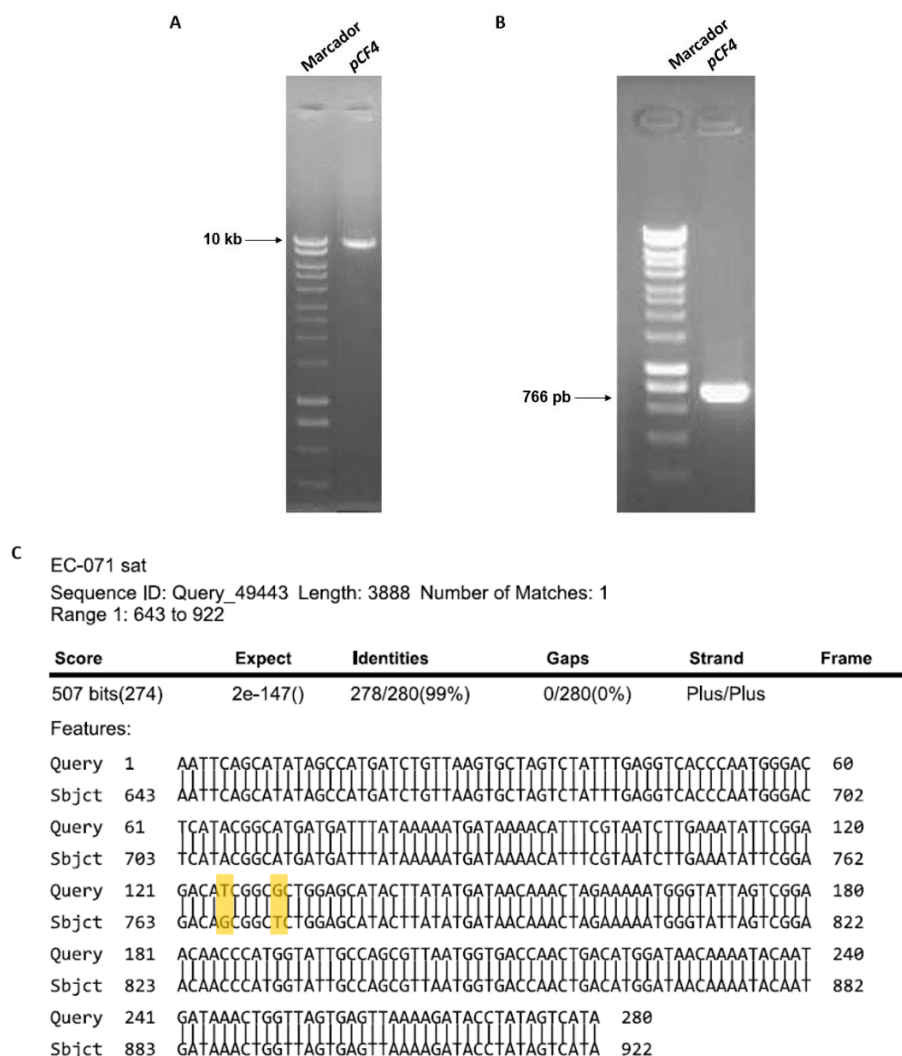
Figura 20 – Obtenção da construção pCF3.



Géis de agarose (0,7%) resultantes da análise eletroforética do (A) produto de PCR resultante da amplificação do gene *sat* da cepa EC071, do (B) produto de PCR resultante da amplificação do vetor *pettac* a partir da miniprep do plasmídeo *pettac mchery* e (C) extração plasmideal resultante do transformante que alberga a construção pCF3. Os géis foram corados com *Midori Green* (Nippon genetics Europe), e após a corrida, foram expostos à luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem. Marcador de peso molecular utilizado: *HyperLadder™ 1Kb* (Bioline).

Com relação à obtenção da construção pCF4, uma reação de PCR foi realizada utilizando-se iniciadores com trocas específicas de nucleotídeos para amplificação do pCF3 com alteração do sítio ativo da proteína codificada pelo gene *sat*. Após tratamento dos produtos de PCR com a enzima DpnI (New England Biolabs), os plasmídeos obtidos foram submetidos a uma nova reação de PCR com os iniciadores *sat2* e os produtos dessa reação foram sequenciados pelo método de Sanger para confirmação da mutação sítio dirigida. A Figura 21 mostra a correta amplificação de pCF4 por PCR, resultando em um plasmídeo de aproximadamente 10 kb, bem como a confirmação da mutação sítio dirigida, como a amplificação da região de 766 pb que contém a mutação e a confirmação da troca de nucleotídeos após o sequenciamento desse fragmento amplificado.

Figura 21 – Obtenção da construção pCF4.



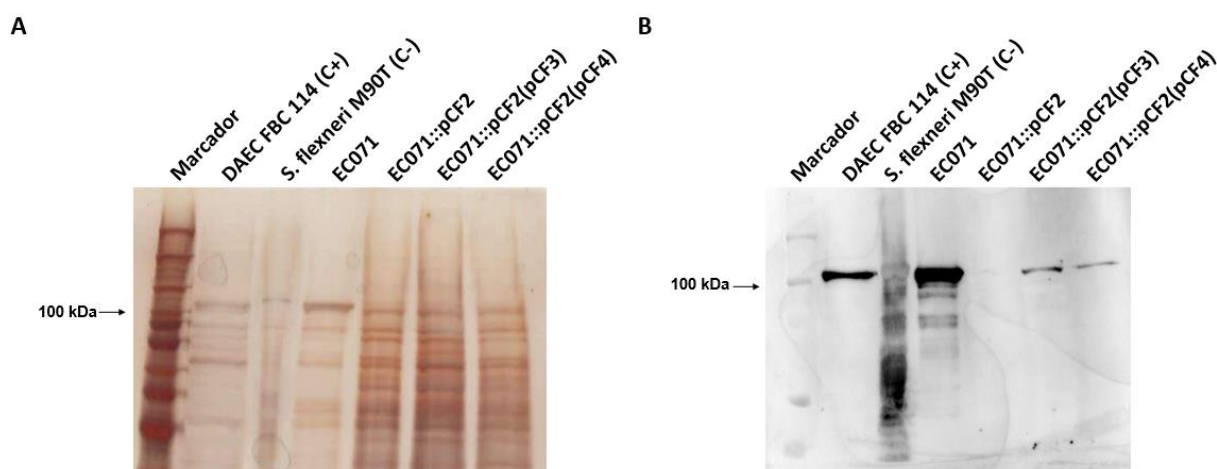
(A) Obtenção da construção pCF4, que corresponde ao produto de PCR resultante da amplificação completa da construção pCF3 com as trocas de nucleotídeos presentes nos iniciadores utilizados. (B) produto de PCR resultante da amplificação da região alvo da mutagênese sítio dirigida, utilizando os primers *sat2*, que foi purificado e sequenciado para confirmação da mutação. Géis de agarose (0,7%) corados com *Midori Green* (Nippon Genetics Europe, Alemanha), resultantes da corrida eletroforética. Após a corrida, os géis foram expostos à luz UV no transiluminador acoplado ao fotodocumentador Alliance (Uvitec) para captura da imagem. Marcador de peso molecular utilizado: HyperLadder™ 1Kb (Bioline). (C) Análise da mutação sítio-dirigida através do alinhamento da sequência do produto de PCR obtido com o iniciador *sat2* e a sequência original do gene *sat* da cepa EC071. Alteração nos nucleotídeos 125 e 130, correspondentes às regiões que codificam os resíduos de serina do sítio ativo de Sat

As construções pCF3 e pCF4 foram transformadas nas cepas EC071, DH5α e MG1655 e os transformantes foram avaliados quanto à expressão de Sat e Sat', conforme mostrado a seguir.

4.5.3 Imunodeteccção de Sat ou Sat' pelas construções genéticas obtidas

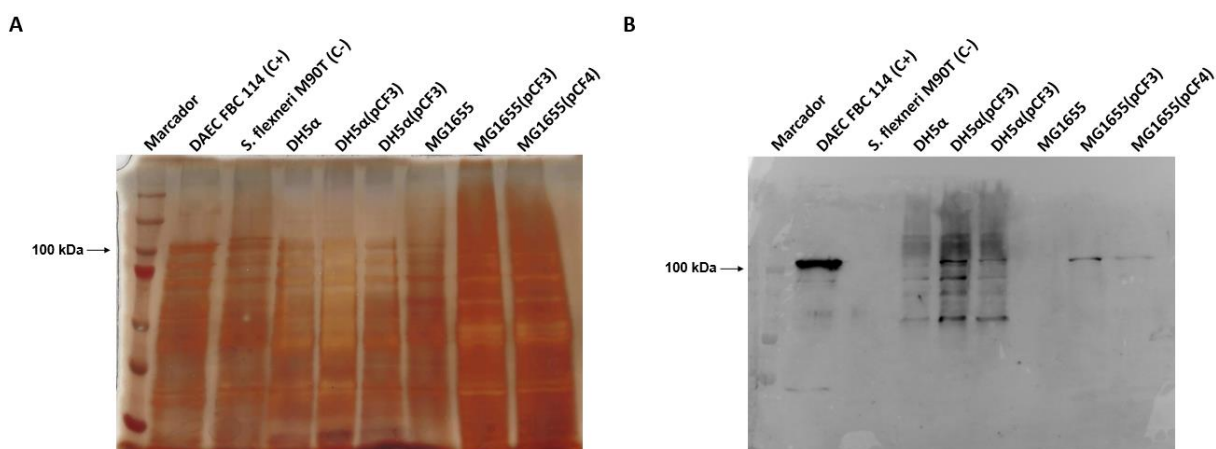
Todas as construções genéticas obtidas nesse trabalho foram testadas para a produção ou ausência de produção de Sat ou Sat', conforme a sua finalidade. Após o tratamento com TCA, as proteínas do sobrenadante de cultura de cada cepa foram analisadas por SDS-PAGE, seguido por coloração por nitrato de prata e imunodeteccção com um soro específico anti-Sat. As Figuras 22 e 23 indicam estes resultados em comparação com as respectivas cepas selvagens de onde as construções obtidas são provenientes. É possível observar de forma qualitativa, que a produção de Sat e Sat' nas cepas que albergam as construções pCF3 e pCF4, respectivamente, não ocorreu em níveis semelhantes ao apresentado pela cepa selvagem EC071. Nota-se também que a interrupção do gene *sat* na cepa EC071 foi bem sucedida, uma vez que a construção EC071::pCF2 não produziu Sat.

Figura 22 - Verificação da produção ou ausência da produção de Sat ou Sat' na cepa EC071 e construções genéticas derivadas.



(A) Gel de poliacrilamida (8%) resultante da análise eletroforética do conteúdo proteico obtido através da precipitação de proteínas do sobrenadante de cultura da cepa EC071 e suas construções genéticas derivadas, corado por nitrato de prata. Marcador: *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards* (BioRad). (B) Membrana de nitrocelulose resultante da transferência do referido conteúdo proteico após análise eletroforética. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteccção de Sat foi realizada com o soro específico anti-Sat (1:500) e soro de coelho anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific).

Figura 23 – Verificação da produção ou ausência da produção de Sat ou Sat' nas cepas DH5 α , MG1655 e construções genéticas derivadas.

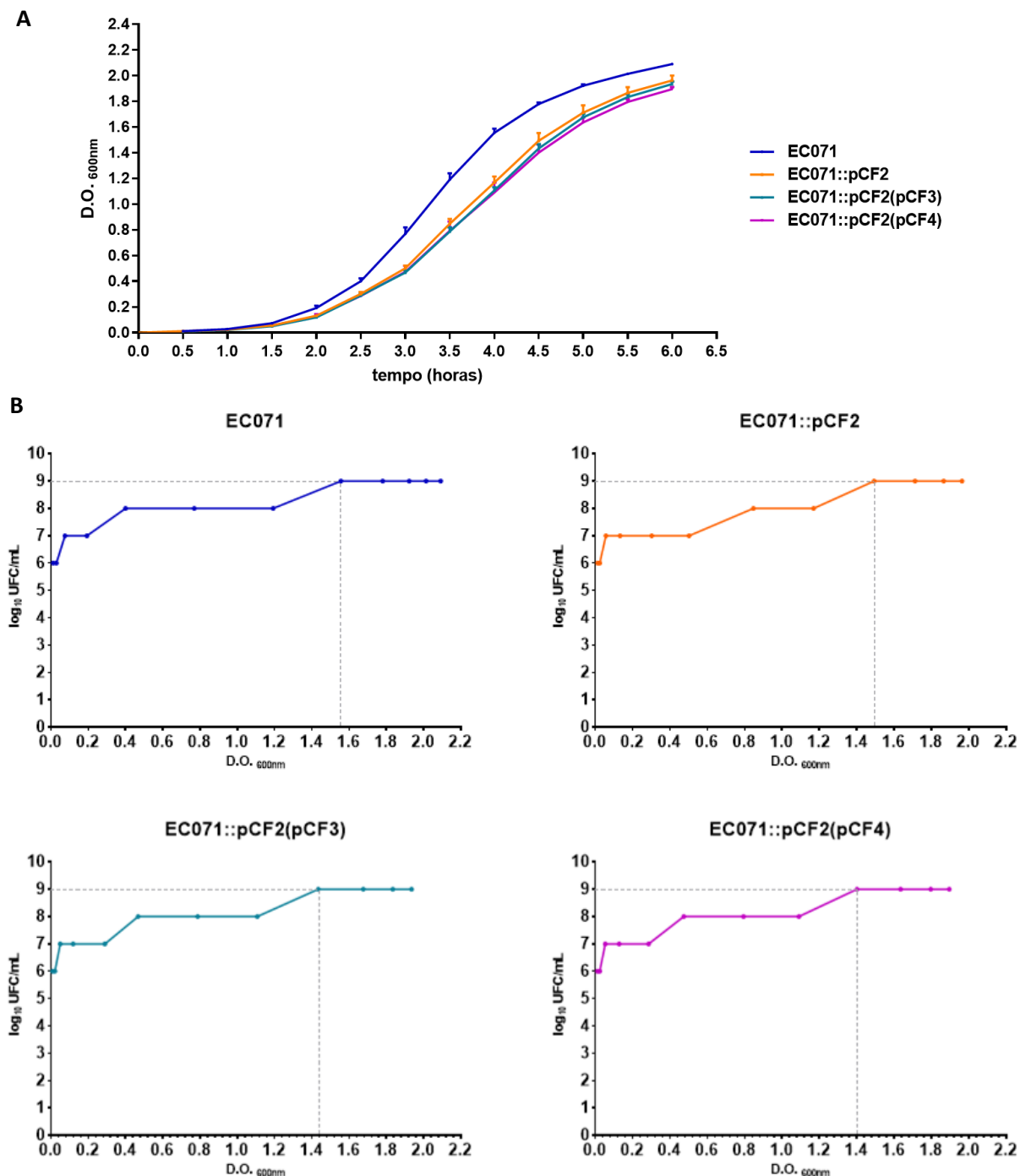


(A) Gel de poliacrilamida (8%) resultante da análise eletroforética do conteúdo proteico obtido através da precipitação de proteínas do sobrenadante de cultura das cepas DH5 α , MG1655 e suas construções genéticas derivadas, corado por nitrato de prata. Marcador: *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards* (BioRad). (B) Membrana de nitrocelulose resultante da transferência do referido conteúdo proteico após análise eletroforética. Marcador: *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad). A imunodeteção de Sat foi realizada com o soro específico anti-Sat (1:500) e soro de coelho anti-IgG conjugado à peroxidase (1:10.000), seguido de revelação com o *kit SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific).

4.6 Curva de crescimento das cepas CFT073, EC071, MG1655 e respectivas cepas derivadas

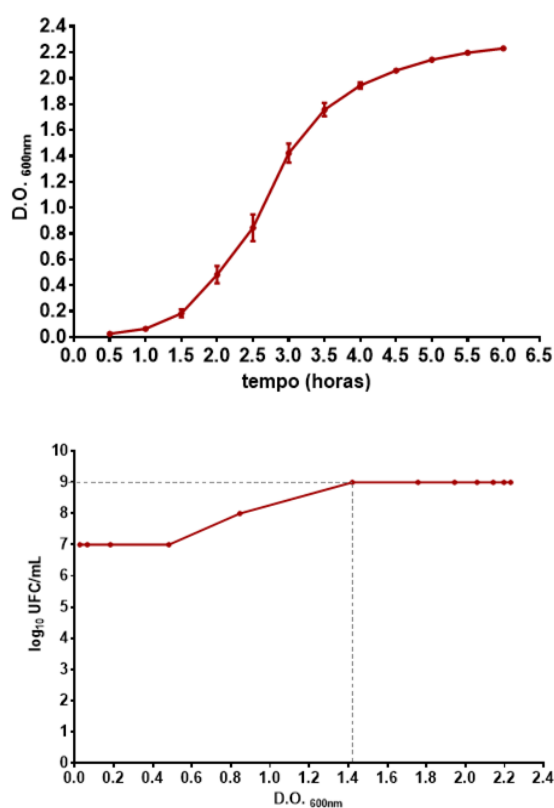
As curvas de crescimento obtidas para as cepas EC071, CFT073, MG1655 e suas respectivas cepas derivadas estão indicadas nas Figuras 24, 25 e 26 respectivamente. Conforme observado nas imagens, as modificações genéticas realizadas não alteram o perfil de crescimento das cepas, em relação às cepas selvagens.

Figura 24 – Curva de Crescimento e média da relação D.O. 600nm da cepa EC071 e cepas derivadas.



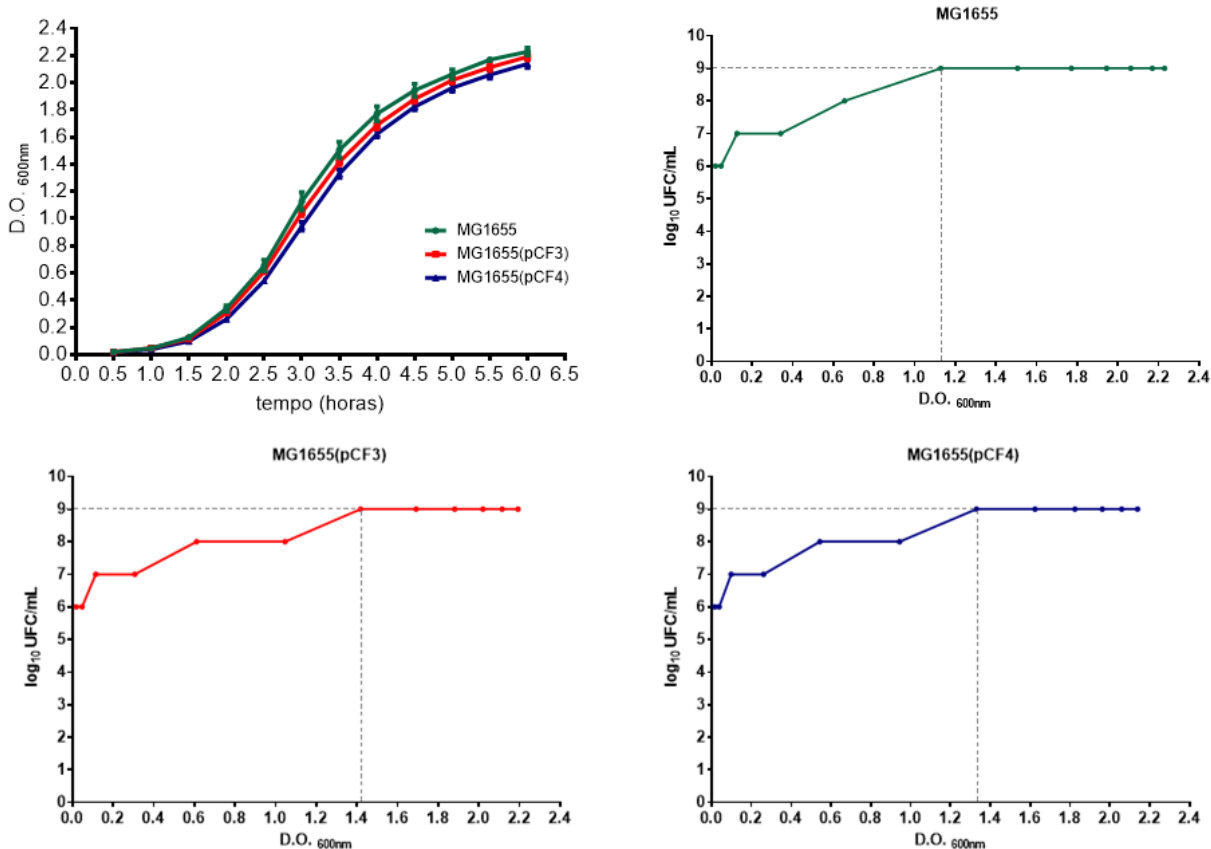
(A) Medida das absorbâncias em 600 nm das culturas em caldo LB cepa EC071 e construções genéticas derivadas, após incubação a 37°C sob agitação a 250 rpm, em diferentes intervalos de tempo durante 6 h. (B) Correspondência entre os números de UFC/mL e as absorbâncias das culturas determinadas em 600nm em cada intervalo de tempo para a cepa EC071 e construções genéticas derivadas. A cada alíquota de cultura retirada para medida de absorbância, uma segunda alíquota foi retirada, diluída seriadamente e semeada em ágar MacConkey (sem antibiótico ou com os antibióticos apropriados) para contagem de UFC/mL.

Figura 25 – Curva de Crescimento e média da relação D.O. 600nm das cepas CFT073.



(A) Medida das absorbâncias em 600 nm das culturas em caldo LB da cepa CFT073 e construções genéticas derivadas, incubadas a 37°C sob agitação a 250 rpm, em diferentes intervalos de tempo durante 6 h. (B) Correspondência entre os números de UFC/mL e as absorbâncias determinadas a 600nm observada em cada intervalo de tempo para a cepa CFT073. A cada alíquota de cultura retirada para medida de absorbância, uma segunda alíquota foi retirada, diluída seriadamente e semeada em ágar MacConkey para contagem de UFC/mL.

Figura 26 – Curva de crescimento e média da relação D.O. 600nm da cepa MG1655 e cepas derivadas.

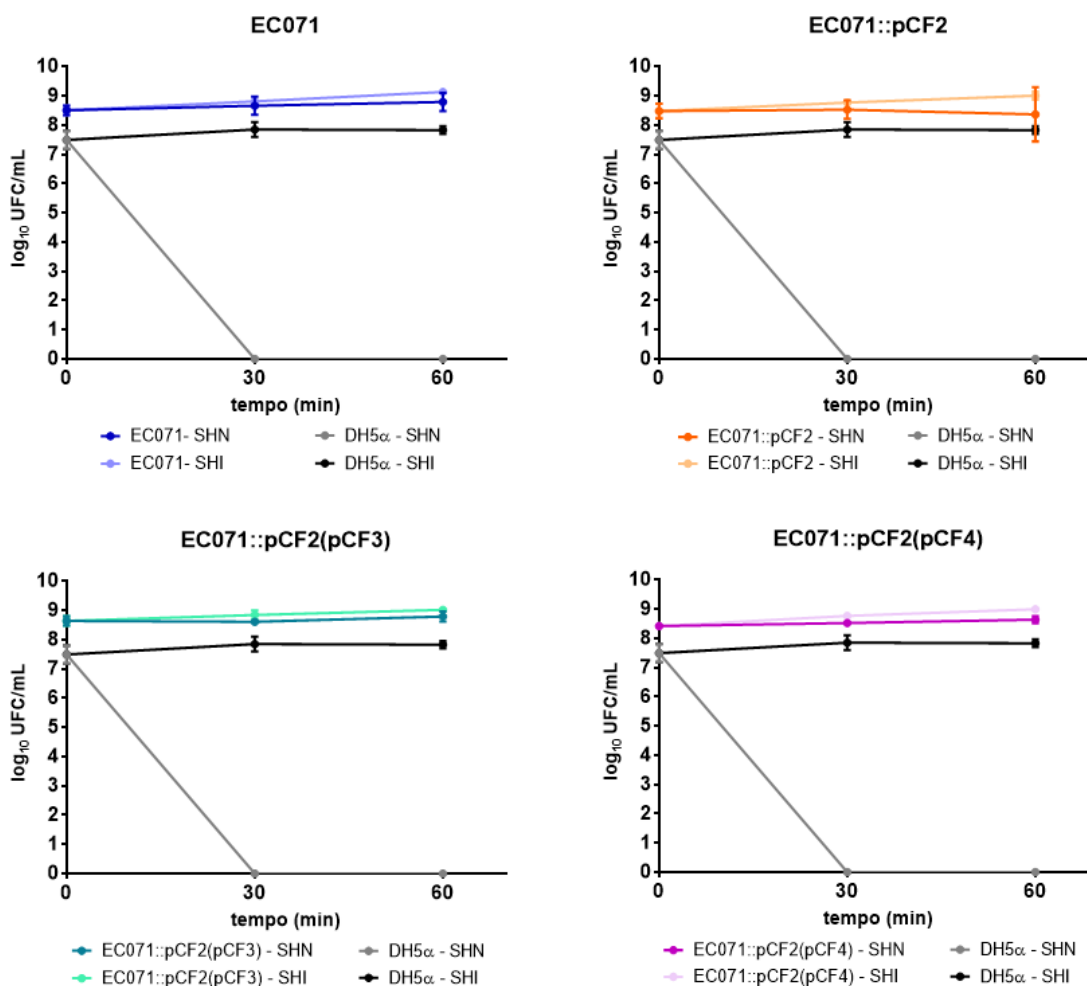


(A) Medida das absorbâncias em 600 nm das culturas em caldo LB sem antibiótico ou com o antibiótico apropriado da cepa MG1655 e construções genéticas derivadas, incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm, em diferentes intervalos de tempo durante 6 h. (B) Correspondência entre os números de UFC/mL e as absorbâncias determinadas a 600nm observada em cada intervalo de tempo para a cepa MG1655 e construções genéticas derivadas. A cada alíquota de cultura retirada para medida de absorbância, uma segunda alíquota foi retirada, diluída seriadamente e semeada em ágar MacConkey (sem antibiótico ou com os antibióticos apropriados) para contagem de UFC/mL.

4.7 Resistência das cepas derivadas da cepa EC071 à ação bactericida do soro humano

A contagem de UFC/mL obtida nos ensaios de resistência ao soro realizados com a cepa EC071 e suas cepas derivadas, na presença de soro humano normal e soro humano inativado, estão expressas na Figura 27. Não houve diferença estatística entre as contagens de UFC/mL das cepas testadas na presença de soro humano normal ($p > 0,05$), indicando que a presença de Sat não é exclusivamente responsável pela resistência ao soro da cepa EC071.

Figura 27 – Resistência das cepas EC071 e cepas derivadas à ação bactericida do soro humano.



Contagens de UFC/mL em ágar MacConkey obtidas para as cepas EC071, suas construções genéticas derivadas e DH5 α (controle de morte), em relação ao seu inóculo inicial (sem contato com soro, correspondente ao tempo zero) e após 30 e 60 min de contato com 50% de soro humano normal (SHN) ou soro humano inativado pelo calor (SHI). As contagens foram analisadas por meio dos testes estatísticos Anova e comparações múltiplas de Tukey, no software GraphPad Prism (versão 7.00), com um intervalo de confiança de 95%.

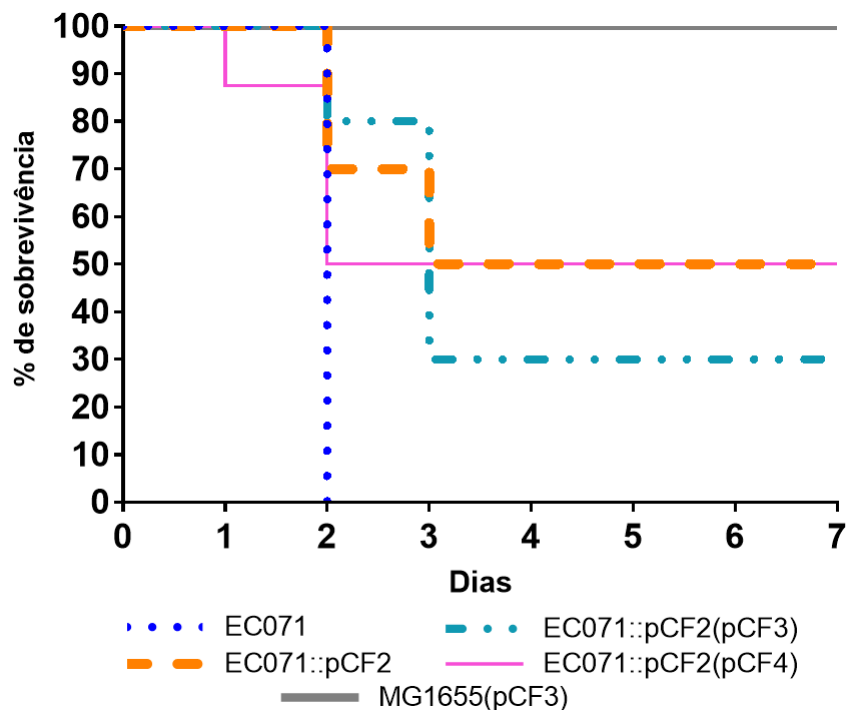
4.8 Modelo murino de sepse

Os grupos experimentais testados no modelo murino de sepse contaram com os seguintes números de animais: EC071, EC071::pCF2 e EC071::pCF2(pCF3) = 10 animais cada; EC071::pCF2(pCF4) e MG1655(pCF3) = 8 animais cada; CFT073 e MG1655 = 4 animais cada.

A cepa CFT073, utilizada como controle positivo neste modelo, provocou a morte de 100% dos animais em até 36 h após a inoculação e a detecção de bactérias viáveis nos órgãos desses animais variou entre 10^2 - 10^5 UFC/g órgão. No caso da cepa MG1655, utilizada como controle negativo, todos os animais sobreviveram durante os sete dias de experimento e nenhuma bactéria viável foi detectada em seus órgãos após o processamento. Esses resultados validaram o modelo padronizado em nosso biotério.

Em seguida procedeu-se às inoculações das cepas de estudo. A porcentagem de sobrevivência dos animais de cada grupo experimental testado no modelo murino de sepse pode ser observada na Figura 28 e a Tabela 15 mostra o resultado da análise estatística dessas porcentagens de sobrevivência. A contagem de UFC/g órgão obtida ao final do experimento para cada órgão analisado pode ser observada na Figura 29.

Figura 28 – Sobrevivência dos camundongos inoculados com a cepa EC071 e suas cepas derivadas no modelo murino de sepse.



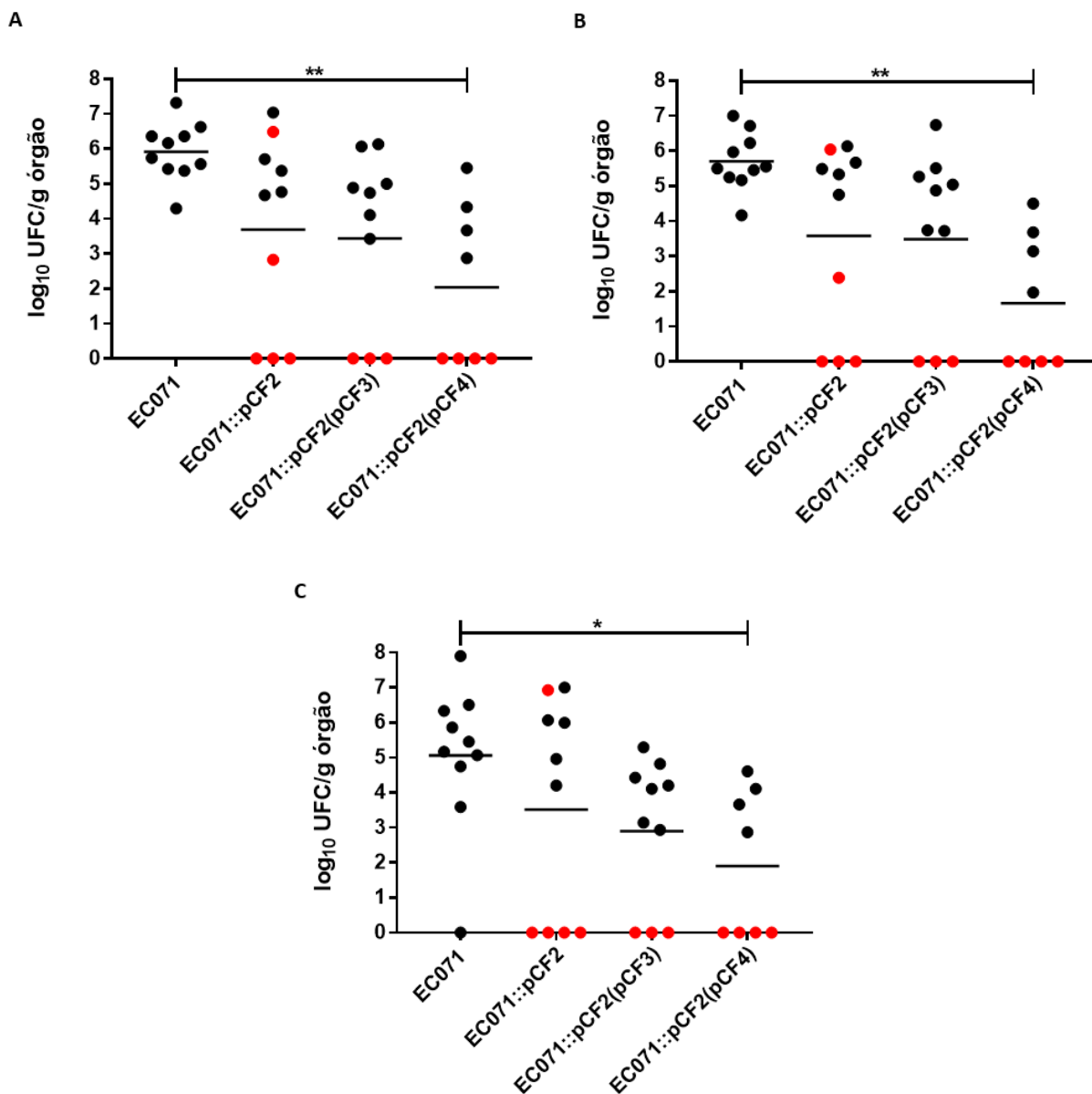
Camundongos Swiss fêmeas foram inoculadas com 2×10^8 UFC da cepa EC071 ou de uma de suas respectivas construções genéticas por via subcutânea e observados por no máximo sete dias. Os animais foram observados diariamente para verificação de sinais clínicos decorrentes do desenvolvimento da infecção.

Tabela 15 – Análise estatística das porcentagens de sobrevivência dos animais inoculados com a cepa EC071 ou uma de suas cepas derivadas.

	EC071::pCF2	EC071::pCF2(pCF3)	EC071::pCF2(pCF4)
EC071	p<0,05	ns	p<0,05
EC071::pCF2		ns	ns
EC071::pCF2(pCF3)			ns

Análise realizada por meio do Teste exato de Fisher no GraphPad Prism (versão 7.00), com intervalo de confiança de 95%. ns: não significativo.

Figura 29 – Contagem de UFC/g órgão dos camundongos inoculados com a cepa EC071 e suas cepas derivadas no modelo murino de sepse.



Contagens de UFC/mL em ágar MacConkey da cepa EC071 ou uma de suas construções genéticas derivadas recuperadas dos órgãos coletados após a morte dos animais infectados. (A) Baço, (B) Fígado e (C) Rins. Os órgãos foram pesados, macerados e diluídos seriadamente para contagem de bactérias viáveis e confirmação da disseminação da infecção. As contagens foram analisadas por meio dos testes estatísticos Anova e comparações múltiplas de Tukey, no software GraphPad Prism (versão 7.00), com um intervalo de confiança de 95%. * = p < 0,05; ** = p < 0,005. Os pontos vermelhos indicam os órgãos dos animais que sobreviveram até o sétimo dia do experimento.

Enquanto a cepa selvagem EC071 foi capaz de causar a morte de todos os animais inoculados no mesmo período (48 h), nota-se uma redução estatisticamente significativa de 50% na letalidade provocada pela cepa mutante em *sat* EC071::pCF2 ($p < 0,05$) e pela cepa mutante complementada com o gene *sat* não funcional EC071::pCF2(pCF4) ($p < 0,05$). No caso dos animais inoculados com a cepa EC071::pCF2(pCF3) (mutante em *sat* complementada com o clone mínimo funcional de *sat*), apenas 30% deles sobreviveram até o sétimo dia do experimento. Com exceção de um animal do grupo EC071::pCF2, todos os demais animais que sobreviveram até o final do experimento não apresentaram bactérias viáveis nos órgãos analisados.

A cepa MG1655(pCF3) não ocasionou a morte de nenhum animal ao longo do experimento e a presença de bactérias viáveis nos órgãos desses animais não foi detectada. Dessa forma, o grupo experimental MG1655(pCF4) não foi realizado, uma vez que o resultado esperado seria semelhante.

Por tanto, o resultado obtido sugere que *Sat* é importante, porém não fundamental, para o estabelecimento da infecção. A presença de bactérias viáveis nos órgãos analisados indica que a infecção foi bem sucedida e a bactéria pôde se disseminar pelo organismo dos animais infectados via corrente sanguínea. No entanto, houve diferença estatística apenas na contagem de UFC/g órgão entre os grupos EC071 e EC071::pCF2(pCF4) (baço: $p < 0,005$; fígado: $p < 0,005$; rins: $p < 0,05$), sugerindo que *Sat* não é fundamental para a colonização desses órgãos após a disseminação da bactéria pelo organismo.

5. DISCUSSÃO

Apesar de colonizarem o trato intestinal de humanos de forma assintomática, as cepas de ExPEC podem causar doença em diversos sítios extraintestinais de indivíduos imunocompetentes, devido ao seu vasto e diverso arsenal de fatores de virulência (RUSSO; JOHNSON, 2000; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; VILA et al., 2016; JOHNSON; RUSSO, 2018). Tal arsenal, que inclui adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro, protectinas e invasinas, confere a estas cepas a capacidade de invadir e colonizar sítios considerados hostis para o patógeno devido à baixa disponibilidade de nutrientes e à presença de mecanismos de defesa da imunidade inata do hospedeiro (TENAILLON et al., 2010; PITOUT, 2012; RODRÍGUEZ-BELTRÁN et al., 2015; JOHNSON; RUSSO, 2018).

Apesar de os patótipos reconhecidos de ExPEC serem usualmente determinados de acordo com o sítio de isolamento, este tipo de classificação é falha, principalmente pelo fato de que a patogenicidade sítio-específica não é dependente de um único fator de virulência, mas sim de uma combinação deles, e pela capacidade de cepas pouco ou não virulentas causarem infecção em sítios extraintestinais de indivíduos imunocomprometidos (DALE; WOODFORD, 2015). Dessa forma, Johnson et al. (2003) propuseram a utilização de cinco diferentes genes como indicadores da virulência intrínseca de uma cepa de ExPEC, que são: *papA* e/ou *papC*; *sfa/foc*; *afa/dra*; *iutA* e *kpsMTII*. A presença de dois ou mais destes genes indica que tal cepa de *E. coli* é capaz de causar doença extraintestinal em um indivíduo imunocompetente, sendo denominada ExPEC ou ExPEC+. Dentre as infecções causadas por ExPEC, destacam-se principalmente as ITU, infecções abdominais e pélvicas, pneumonia, meningites e as ICS (RUSSO; JOHNSON, 2003).

No Brasil e no mundo, *E. coli* figura como o principal patógeno Gram negativo causador de quadros de ICS (MENEZES et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; VENDEMIATO et al., 2015; CARLESSE et al., 2016; SABINO et al., 2019; KERN; RIEG, 2020), que se originam principalmente a partir de infecções primárias como as ITU (MIAJLOVIC et al., 2016; BONTEN et al., 2020). No entanto, também podem ocorrer devido à translocação bacteriana a partir do intestino ou pela inserção de dispositivos médicos intravasculares (RUSSO; JOHNSON, 2003; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; MELLATA et al., 2016; VILA et al., 2016). O

estabelecimento e evolução deste quadro dependem de fatores relacionados ao patógeno e ao hospedeiro, como a virulência e a resposta imune, respectivamente (VENDEMIATO et al., 2015). Porém, quando o patógeno consegue se desvencilhar de forma bem sucedida dos mecanismos do sistema imune do hospedeiro, a resposta deste último pode se tornar descompensada e danosa para o hospedeiro, de forma que o quadro evolui então para a sepse (SINGER et al., 2016; VAN DER POLL et al., 2017).

O sistema complemento faz parte da imunidade inata do hospedeiro e tem como sua principal função a eliminação de patógenos. Sua ativação pode ocorrer por três diferentes vias (clássica, alternativa e das lectinas), que convergem na ativação da via terminal, resultando na formação do MAC. De forma geral, a ativação deste sistema leva à eliminação do patógeno através de processos como a inflamação, opsonização e lise osmótica (MERLE et al., 2015a; MACEDO; ISAAC, 2016; LUBBERS et al., 2017).

Uma das estratégias utilizadas por *E. coli* para evadir desse mecanismo da imunidade inata envolve a clivagem direta de proteínas componentes do sistema complemento através de proteases secretadas, como é o caso das SPATEs Pic e EspP, já caracterizadas quanto à ação proteolítica sobre essas proteínas (ORTH et al., 2010; ABREU et al., 2015, 2016).

A frequência de genes que codificam SPATEs em coleções de ExPEC isoladas da corrente sanguínea têm sido observadas por diferentes autores nos últimos anos e o gene *sat* figura entre os mais frequentes (PARHAM et al., 2005; ANANIAS; YANO, 2008; MAHJOUR-MESSAI et al., 2011; SKJØT-RASMUSSEN et al., 2012; MORA-RILLO et al., 2015; MIAJLOVIC et al., 2016; CLERMONT et al., 2017; HUNG et al., 2019; NOJOO MI; GHASEMIAN, 2019; PARAMITA et al., 2020).

A SPATE Sat, objeto de estudo do presente trabalho, é uma SPATE de classe 1 e seus efeitos citotóxicos sobre linhagens celulares dos tratos urinário e gastrointestinal, sobre células endoteliais e outros substratos biológicos já estão bem descritos na literatura (GUYER et al., 2000, 2002; DUTTA et al., 2002; TADDEI et al., 2005; MARONCLE et al., 2006; GUIGNOT et al., 2007; MOAL et al., 2011; VIEIRA et al., 2020). Somados à alta frequência do gene *sat* observada em cepas de *E. coli* isoladas de ICS, estes dados sugerem que Sat pode estar envolvida em importantes estágios da patogênese de infecções extraintestinais, como as ICS. No entanto, nenhum efeito imunomodulatório desta SPATE foi reportado até o momento. Dessa

forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar o papel de Sat na evasão do sistema imune por *E. coli* durante o curso da sepse.

A primeira parte deste trabalho compreendeu a verificação da frequência do gene *sat* e outros genes 11 que codificam SPATEs em 278 cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia humana. Após análise por PCR, os genes *sat* (34,2%), *vat* (28,4%) e *pic* (8,3%) foram detectados com maior frequência. Da mesma forma, outros estudos também reportaram alta frequências de *sat* entre cepas isoladas de bacteremia, variando entre 22% e 70% (PARHAM et al., 2005; ANANIAS; YANO, 2008; MAHJOUR-MESSAI et al., 2011; SKJØT-RASMUSSEN et al., 2012; MORA-RILLO et al., 2015; MIAJLOVIC et al., 2016; CLERMONT et al., 2017; HUNG et al., 2019; NOJOOI; GHASEMIAN, 2019; PARAMITA et al., 2020). Em relação à presença de *vat*, frequências que variam entre 10 e 70% foram relatadas por cinco autores (PARHAM et al., 2005; MAHJOUR-MESSAI et al., 2011; TAPADER et al., 2014; HUNG et al., 2019; NOJOOI; GHASEMIAN, 2019; PARAMITA et al., 2020). Considerando os efeitos citotóxicos de Sat sobre células do trato urinário e endoteliais (GUYER et al., 2000, 2002; MARONCLE et al., 2006; VIEIRA et al., 2020), e sabendo que as ITU são a principal fonte de origem das ICS (MIAJLOVIC et al., 2014, 2016; BONTEN et al., 2020), é razoável aceitar a hipótese de que esta protease pode estar envolvida no estabelecimento e/ou estágios iniciais das ICS. O mesmo pode ser inferido para *Vat*, uma vez que sua ação citotóxica sobre a linhagem celular 5637 (célula humana epitelial de bexiga) (DÍAZ et al., 2020) e seu envolvimento na patogênese da cepa UPEC CFT073 em um modelo murino de infecção sistêmica (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013) já foram observados.

Ainda, o contexto dos trabalhos citados inclui *sat* e *vat* em pesquisas mais amplas de fatores de virulência relacionados à patogênese de ExPEC, de forma a não incluir a detecção de todos os genes que codificam SPATEs até o momento. Tapader et al. (2014) realizaram uma análise mais abrangente da presença desses genes em uma coleção de cepas de ExPEC isoladas de sepse neonatal. Os resultados encontrados são semelhantes aos reportados no presente estudo, sendo *vat* e *sat* os genes mais frequentemente encontrados (nessa ordem), seguidos de *espP*, *sepA*, *pet* e *pic*.

Considerando que as ITU são a principal fonte de infecções da corrente sanguínea causada por *E. coli* (MIAJLOVIC et al., 2014, 2016; BONTEN et al., 2020), é esperado que exista similaridade genética entre cepas isoladas desses dois tipos

de infecção. Apesar disso, como observado em ExPECs isoladas da corrente sanguínea, a maioria dos estudos publicados a respeito de cepas isoladas de ITU reúne dados sobre a frequência de genes que codificam SPATEs relacionados a patótipos extraintestinais, como *sat*, *vat* e/ou *tsh*, com apenas alguns deles pesquisando por *pic/picU* (VILA et al., 2002; MOMTAZ et al., 2013; MIRANDA-ESTRADA et al., 2017; MOSTAFAVI et al., 2019). Considerando todos os dados disponíveis nesses estudos, *sat* foi o gene mais frequente em cepas de UPEC, seguido por *vat*, *pic* e *tsh*. Restieri et al. (2007) realizaram uma pesquisa abrangente de genes que codificam SPATEs em UPEC e o mesmo perfil de prevalência mencionado anteriormente foi observado, concordando também com os resultados obtidos no presente trabalho. Apesar das SPATEs serem mais conhecidas por seu papel na patogênese de doenças intestinais e do trato urinário, é possível que essas proteases também estejam envolvidas nos estágios iniciais do estabelecimento ICS, seja na aquisição de ferro, na evasão do sistema imune e/ou na intensificação das alterações na coagulação (MIAJLOVIC; SMITH, 2014).

Usualmente, a maioria dos genes que codificam SPATES associados à patogênese de DEC não são pesquisados em ExPEC. *pic* é uma exceção, aqui reportado em uma frequência mais baixa (8,3%) do que a observada por outros dois autores (9% e 20%) (TAPADER et al., 2014; MIAJLOVIC et al., 2016). Além dos efeitos mucinolítico e hemaglutinante (HENDERSON et al., 1999; DUTTA et al., 2002; PARHAM et al., 2004), Pic também exerce ação proteolítica contra algumas proteínas do sistema complemento (ABREU et al., 2015, 2016) e degrada glicoproteínas da superfície de leucócitos (RUIZ-PEREZ et al., 2011), constituindo um importante mecanismo de evasão ao sistema imune do hospedeiro durante infecções de sítios extraintestinais ocasionadas por *E. coli*. *espC*, *eatA* e *espl* também foram detectados no presente estudo. Enquanto EspC é uma enterotoxina primeiramente descrita em EPEC (MELLIES et al., 2001), capaz de clivar hemoglobina e o fator V de coagulação (DUTTA et al., 2002; DRAGO-SERRANO; GAVILANES PARRA; ANGEL MANJARREZ-HERNÁNDEZ, 2006), EatA está envolvida na clivagem de uma adesina glicoproteica presente em ETEC, que aumenta a liberação da toxina termolábil (LT) (ROY et al., 2011). Finalmente, Espl é secretada por STEC e degrada proteínas do plasma, mas seu papel na patogênese ainda precisa ser elucidado (SCHMIDT et al., 2001). No contexto das ICS, esses fatores de virulência podem estar envolvidos nos processos de aquisição de ferro durante o crescimento bacteriano, de forma a permitir

a persistência da bactéria no sangue, e ainda promover a intensificação de alterações na coagulação, favorecendo a evolução do quadro para sepse (MIAJLOVIC; SMITH, 2014; SINGER et al., 2016).

A frequência de genes que codificam SPATEs em coleções de DEC analisadas por outros autores, difere de forma expressiva da frequência observada em ExPEC neste trabalho. SPATEs que foram primeiramente descritas em patótipos intestinais, tais como *pic*, *pet*, *sepA* e *espC*, foram significativamente mais frequentes nesses estudos (RESTIERI et al., 2007; ABREU et al., 2013; ZUDE; LEIMBACH; DOBRINDT, 2014; ANDRADE et al., 2017). No entanto, *sat* foi o gene mais frequentemente encontrado em trabalhos envolvendo cepas de DEC isoladas em diferentes países, seguido por *pic* e *sepA* (BOISEN et al., 2009, 2012). Esses achados reforçam a evidência de que algumas SPATEs são fatores de virulência associados a certos patótipos.

A baixa frequência observada dos genes *tsh*, *espP*, *eatA*, *espl*, *sepA*, *sigA*, *espC* e *pet* era esperada, uma vez que eles são associados com a patogênese de APEC e outros patótipos de DEC, respectivamente (HENDERSON; NATARO, 2001). Considerando que DEC e ExPEC coabitam no intestino, eventos de HGT podem ter favorecido a aquisição desses genes pelos isolados da corrente sanguínea analisados.

Os dados relatados no presente estudo, referentes à pesquisa de genes que codificam SPATEs, avaliação da virulência intrínseca e classificação filogenética da coleção de *E. coli* isolada de bacteremia foram publicados no artigo “Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) are largely distributed among *Escherichia coli* isolated from the bloodstream” (FREIRE et al., 2020).

Após a confirmação de que *sat* era o gene mais frequente na coleção analisada, a cepa EC071 foi escolhida como cepa de trabalho para o prosseguimento das análises, uma vez que possuía apenas o gene *sat* dentre as SPATEs. A produção de Sat no sobrenadante de cultura da cepa EC071 foi confirmada por imunodeteção com um soro anti-Sat obtido em outro estudo (Vieira et al., 2020), validando assim a sua seleção como protótipo para o presente estudo. Além disso, a cepa EC071 apresentou o fenótipo de resistência à ação bactericida ao soro, indicando que uma ou mais proteínas secretadas por ela atuavam na inativação dos componentes do sistema complemento. Dessa forma, Sat era uma candidata a mediar esse mecanismo de evasão ao sistema imune inato.

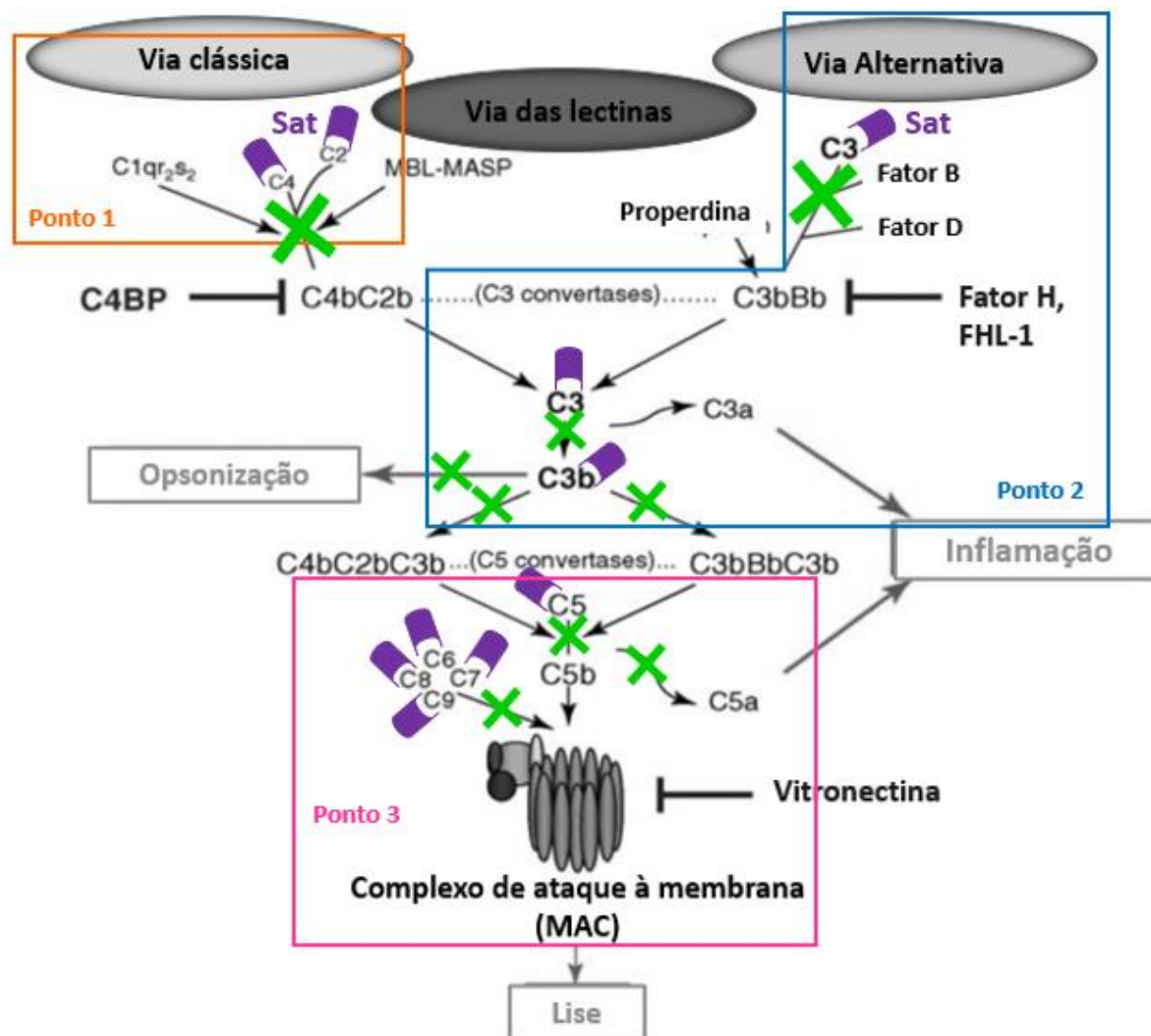
O sequenciamento completo de seu genoma confirmou a presença do gene *sat* e a ausência de outros genes que codificam SPATEs. Porém alguns genes relacionados a mecanismos de resistência ao soro foram detectados, como genes que codificam OMPs (*ompX*, *ompTc* e *ompTp*) e o gene que codificam as proteases Prc e Nlpl. Enquanto as principais OMPs conhecidas relacionadas à resistência à atividade bactericida do soro são OmpA, OmpW e Nlpl, que interagem de diferentes formas com proteínas do complemento, como C4BP e fator H, Prc é uma protease que interfere na ativação da via clássica e da deposição do MAC (TSENG et al., 2012; WANG et al., 2012; LI et al., 2016)

A análise do perfil plasmideal e do sequenciamento completo do genoma da cepa EC071 indicaram que o gene *sat* está presente no cromossomo desta cepa. Tal evidência é suportada pelo fato de que, enquanto a análise por *Southern blot* mostrou que o gene *sat* não estava presente em nenhum dos quatro possíveis plasmídeos identificados, a análise de bioinformática realizada no genoma desta cepa mostrou a presença de cinco diferentes origens de replicação em *contigs* diferentes daquele onde está o gene *sat*. O mesmo foi observado por outros autores e, até o momento, não há descrições na literatura sobre a ocorrência de *sat* em plasmídeos. Na cepa protótipo UPEC CFT073, este gene está localizado na ilha de patogenicidade II (PAI II) (GUYER et al., 2000) de seu cromossomo. No entanto, é importante salientar que as análises de bioinformática verificaram que esta ilha não está presente no genoma da cepa EC071. Guignot et al. (2007) demonstraram que o gene *sat* da cepa Afa/Dr DAEC IH11128 também é cromossômico e está inserido em uma ilha de patogenicidade semelhante a PAI II da UPEC CFT073. Já no caso da cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917, utilizada no tratamento de doenças intestinais inflamatórias, o gene *sat* também é cromossômico e está inserido na ilha genômica II dessa cepa. Curiosamente, esta cepa probiótica expressa a respectiva proteína Sat, mas a mesma não atua como fator de virulência, uma vez que outros componentes de seu sobrenadante de cultura neutralizam a ação desta toxina (TOLOZA et al., 2015).

Após a purificação da proteína Sat a partir do sobrenadante de cultura da cepa EC071, ensaios proteolíticos foram realizados para verificar quais proteínas do sistema complemento constituíam substratos da ação proteolítica de Sat, considerando a sua capacidade de resistir à atividade bactericida do soro. Dentre todas as proteínas do sistema complemento avaliadas, apenas C1q não constituiu substrato para Sat. Com exceção de C7, os ensaios proteolíticos realizados sugerem

que a clivagem dessas proteínas por Sat ocorre de forma dependente da quantidade de protease utilizada e do tempo de incubação. As moléculas de C2, C4, C4b, C6 foram clivadas de maneira mais efetiva, com produtos de degradação observados em 5 h e na presença da menor quantidade de Sat testada (0,5 µg). A clivagem de C3, C3b, C5, C7, C8 e C9 também foi observada na presença de 0,5 µg de Sat, porém apenas após a incubação por 24 h. Os resultados obtidos nesses ensaios sugerem que a abrangência da atividade proteolítica de Sat sobre quase todos os componentes da cascata de ativação do sistema complemento permite o bloqueio desse mecanismo da imunidade inata do hospedeiro em três pontos estratégicos, indicados na Figura 30, de forma a impedir seus efeitos diretos e indiretos sobre o patógeno invasor. Ainda, os resultados obtidos também permitem concluir que o sítio ativo de serinoproteases presente na estrutura de Sat é responsável pela sua ação proteolítica sobre as proteínas do complemento, uma vez que não foram observadas degradações nos substratos testados na presença de PMSF.

Figura 30 – Possíveis pontos de bloqueio da ativação do sistema complemento pela ação proteolítica de Sat, com base nos resultados obtidos no presente estudo.



Fonte: Adaptado de Hallström e Riesbeck (2010).

A ação proteolítica de Sat sobre as moléculas do complemento permite o bloqueio do sistema em três diferentes pontos. Ponto 1: bloqueio da via clássica pela clivagem direta das proteínas C2 e C4, impedindo a formação da C3 convertase C4b2a; Ponto 2: bloqueio da via alternativa pela clivagem direta das proteínas C3 e C3b, impedindo a conversão de C3 em C3a e C3b, a formação da C3 convertase C3bBb e das C5 convertases C4b2a3b ou C3bBb3b e finalmente, bloqueando o mecanismo de opsonização; Ponto 3: bloqueio da via terminal através da clivagem direta das proteínas C5, C6, C7, C8 e C9, impedindo a conversão de C5 em C5a e C5b, a montagem do MAC e efeitos pró-inflamatórios decorrentes da liberação de C5a.

Conforme mencionado anteriormente, o sistema complemento pode ser ativado por uma de suas três vias iniciais e efeitos indiretos dessa ativação podem ocorrer e promover a eliminação do patógeno (RICKLIN et al., 2010; MERLE et al., 2015a). Portanto, diferentes pontos de bloqueio presentes nos estágios iniciais da ativação desse sistema tornam-se importantes estratégias para proteção do patógeno. Em relação às vias clássica e das lectinas, o bloqueio pode ocorrer por meio da degradação de C2, C4 e C4b, uma vez que essas proteínas estão envolvidas na formação da C3 convertase dessas vias, denominada C4b2a (RICKLIN et al., 2010; MERI, 2016; LUBBERS et al., 2017). Dessa forma, a ação proteolítica de Sat sobre essas proteínas sugere o bloqueio da conversão de C3 em C3a e C3b e consequentemente, na inativação das funções biológicas desempenhadas por essas proteínas. A ação proteolítica da SPATE Pic em *E. coli* e da termolisina LIC13322 (fragmentos PepSY-M4 e M4) de *Leptospira* patogênica sobre C2, C4 e C4b também já foi demonstrada (FRAGA et al., 2014; ABREU et al., 2015, 2016).

O ponto mais estratégico para evasão do sistema complemento pelo patógeno é a degradação de C3 e C5 (ABREU et al., 2015). Além de C3 e C5, os fragmentos gerados pela clivagem fisiológica dessas proteínas também estão envolvidos em importantes processos de eliminação de patógenos. Enquanto C3/C3b participam de todas as vias de ativação do sistema complemento e de processos como a opsonização, C5b está envolvido na formação do MAC. Ainda, C3a e C5a constituem potentes anafilotoxinas responsáveis por promover uma forte resposta inflamatória que visa a eliminação do patógeno (MERLE et al., 2015a, 2015b; VAN DER POLL et al., 2017). Dessa forma, a ação proteolítica de Sat sobre C3, C3b e C5 *in vitro* sugere que a ativação das três vias do sistema complemento, a fagocitose e o início da resposta inflamatória desencadeada pela presença do patógeno na corrente sanguínea são inibidas, tornando essas proteínas do sistema complemento alvos estratégicos para garantir a evasão completa destes mecanismos da imunidade inata pela bactéria (RICKLIN et al., 2010). C3/C3b e C5 também foram identificadas como alvos de Pic e EspP, outras SPATES produzidas por *E. coli* (ORTH et al., 2010; ABREU et al., 2015, 2016) e de outras proteases secretadas por espécies de *Leptospira* patogênicas (FRAGA et al., 2014), *Neisseria meningitidis* (DEL TORDELLO et al., 2014) e *S. aureus* (JUSKO et al., 2014).

Finalmente, a degradação das proteínas envolvidas na formação do MAC confere proteção ao patógeno contra a inserção do complexo que forma o poro em

sua superfície, de forma a prevenir a sua eliminação por lise osmótica (MORGAN; BOYD; BUBECK, 2017). Por tanto, a ação proteolítica de Sat sobre C6 sugere o impedimento da montagem do MAC, uma vez que C5b depende de C6 para se estabilizar e permitir a ligação dos demais componentes da via terminal (RICKLIN et al., 2010; MERLE et al., 2015a). Ainda, a ação proteolítica de Sat sobre C7, C8 e C9, mesmo que não tão efetiva quanto sobre C6, pode conferir uma proteção extra nos casos em que o complexo continue a ser montado. Até o momento, apenas dois trabalhos avaliaram a ação de proteases bacterianas sobre proteínas da via terminal. Enquanto Amamura et al. (2017) relataram a ação proteolítica da metaloprotease termolisina, produzida por *Leptospira* patogênicas, sobre C5, C6, C7, C8 e C9, o mesmo foi observado por Honda-Ogawa et al. (2013) com a cisteinoprotease SpeB de *Streptococcus pyogenes*. Finalmente, o fato de todas as proteínas da via terminal serem substratos de Sat e das proteases SpeB e termolisina pode ser explicado pelas similaridades estruturais apresentadas por essas proteínas, uma vez que compartilham domínios comuns (HADDERS et al., 2012; BUBECK, 2014; AMAMURA et al., 2017; MORGAN; BOYD; BUBECK, 2017).

A fim de se observar os efeitos de Sat sobre as proteínas do sistema complemento considerando o contexto genético da cepa EC071, construções genéticas foram realizadas para obter a cepa EC071 mutada no gene *sat* e a cepa EC071 mutada no gene *sat* complementada com os clones mínimos de expressão de Sat e Sat sem ação de serinoprotease. Essas construções foram testadas quanto a resistência à ação bactericida do soro humano, em comparação com a cepa *E. coli* K-12 DH5 α . No entanto, não houve diferença entre a sobrevivência da cepa selvagem e suas construções derivadas, uma vez que, no teste realizado com o soro humano normal, a contagem de UFC/mL foi sempre igual ou superior ao inóculo inicial do teste, em todos os intervalos de tempo. Este resultado sugere que outros elementos do genoma da EC071 codifiquem fatores de virulência que confirmam a esta cepa a resistência a essa ação bactericida e Sat seja um cofator nessa evasão ao sistema imune inato. Como demonstrado no sequenciamento completo do seu genoma, a EC071 possui alguns genes que codificam proteínas de membrana externa e a protease Prc. Caso essas proteínas sejam produzidas pela EC071, seria interessante verificar em um futuro trabalho se a resistência de cepas EC071 mutantes em *sat* e em alguns desses genes sofrem uma diminuição nessa resistência, de forma a averiguar se somente estes genes são responsáveis por este fenótipo ou se há ainda

algum elemento genético não caracterizado no genoma da EC071 que confira esta propriedade de virulência para a cepa.

A cepa EC071 e suas construções genéticas derivadas também foram testadas em um modelo murino de sepse proposto por Picard et al. (1999), de forma que a sobrevivência dos animais infectados com cada uma dessas cepas fosse avaliada. Uma vez que Sat purificada foi capaz de clivar proteínas do sistema complemento, era esperado que essa protease fosse coadjuvante na patogênese da sepse. As cepas de UPEC CFT073 e *E. coli* K-12 MG1655 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Enquanto a cepa CFT073 ocasionou a morte de 100% dos animais infectados e a sua presença foi detectada nos rins, baço e fígado, todos animais infectados com a cepa MG1655 sobreviveram e seus órgãos estavam estéreis ao final dos sete dias de experimento. Esses resultados validam o modelo utilizado, conforme utilizado por outros autores (JOHNSON et al., 2006, 2012, 2015, 2019; MORA et al., 2014; MERINO et al., 2020).

Inicialmente foram analisados os dados de sobrevivência dos animais inoculados com as diferentes construções, em comparação aos dados com a cepa selvagem. Enquanto a cepa selvagem ocasionou a morte de 100% dos animais inoculados após 48 h da inoculação, a ausência de *sat* (cepas EC071::pCF2 e EC071::pCF2(pCF4)) reduziu a morte para 50% (EC071 x EC071::pCF2 = $p < 0,05$; EC071 x EC071::pCF2(pCF4) = $p > 0,05$). Ainda, a complementação do gene *sat* na cepa mutante (EC071::pCF2(pCF3)) restaurou parcialmente o efeito observado com a cepa selvagem (resultando em uma sobrevivência de apenas 30%). Tal efeito pode ser devido ao fato de que o clone mínimo de expressão de *sat* (pCF3) expressa *in vitro* a proteína Sat em quantidades menores do que as observadas para a cepa selvagem, conforme pode ser observado de forma qualitativa na Figura 22.

Em relação às contagens de UFC/g órgão, apenas a comparação entre as contagens obtidas nos órgãos das cepas EC071 e EC071::pCF2(pCF4) apresentou significância estatística ($p < 0,005$ para fígado e baço; $p < 0,05$ para os rins), respectivamente). No conjunto, esses resultados sugerem que Sat está envolvida no estabelecimento e disseminação da infecção, mas não na colonização de órgãos afetados de maneira secundária em relação ao sítio primário de infecção. Esta inferência é suportada também pelos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* realizados no presente trabalho, sugerindo que o estabelecimento e disseminação da infecção

dependem, pelo menos parcialmente, da ação proteolítica de Sat sobre as proteínas do complemento.

O fato de que a cepa MG1655 carreando o clone mínimo de expressão de Sat (pCF3) não tenha ocasionado a morte de nenhum animal e ao final do experimento os órgãos destes estavam estéreis, pode ser atribuído a dois fatores distintos: (a) o clone mínimo de expressão de Sat pCF3 não expressa *in vivo* Sat em níveis suficientes para ocasionar um efeito detectável no modelo animal; (b) Sat não é o único fator de virulência responsável pelo estabelecimento e pela disseminação da infecção pela cepa EC071. De fato, outros autores observaram neste mesmo modelo animal que a severidade da infecção está relacionada a diversas combinações de fatores de virulência apresentadas pelas cepas e que adesinas, protectinas e sistemas de captação de ferro são fundamentais para colonização, evasão do sistema imune e captação de nutrientes para sobrevivência da cepa em sítios extraintestinais (PICARD et al., 1999; JOHNSON et al., 2006, 2012, 2015, 2019; MORA et al., 2014; MERINO et al., 2020). Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho levantam duas hipóteses interessantes: (a) *sat* pode estar envolvido na virulência intrínseca de ExPEC, uma vez que a cepa EC071 é considerada uma ExPEC⁺ (*papA*, *papC* e *afa/dra*) de acordo com o critério estabelecido por (JOHNSON et al., 2003); (b) a presença/ausência do gene *sat* impactaria de forma diferente na sobrevivência de animais infectados com cepas que possuam um contexto genético de virulência diferente do apresentado pela cepa EC071. Considerando que as modificações genéticas realizadas na cepa selvagem não provocaram a interrupção de nenhum dos genes considerados para esse critério presentes no seu genoma, era esperado que as construções genéticas também ocasionassem a morte dos animais por elas infectados. Portanto, a sobrevivência dos animais infectados com EC071::pCF2, EC071::pCF2(pCF3) e EC071::pCF2(pCF4) sugere que a ausência de *sat* pode ter alterado a virulência intrínseca dessas cepas. Ainda, também seria interessante avaliar o envolvimento de *sat* no estabelecimento de uma infecção causada por uma cepa virulenta de *E. coli*, porém considerada ExPEC⁻.

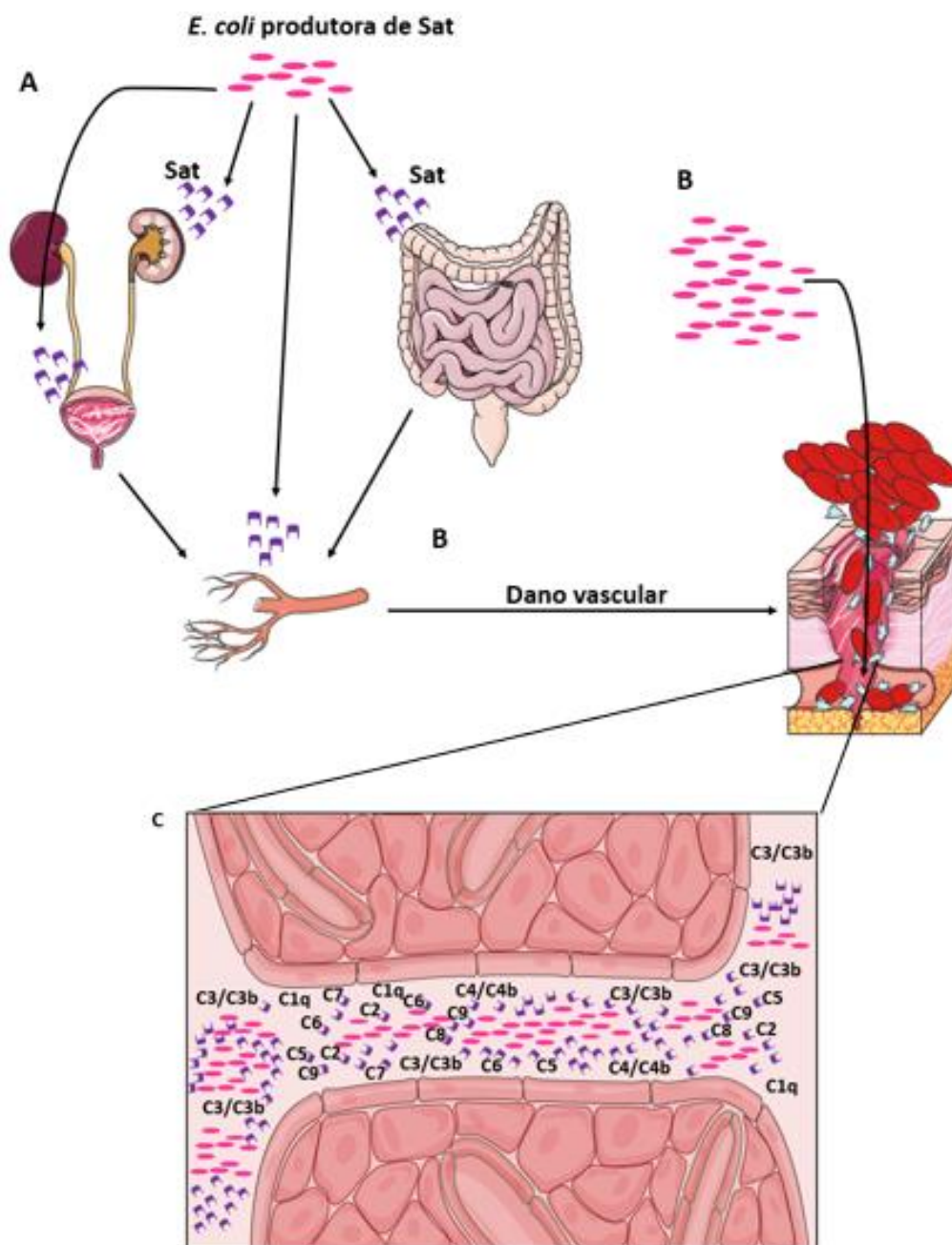
Considerando que as cepas avaliadas foram inoculadas por via subcutânea, sugere-se também a importância da atividade citotóxica de Sat (GUYER et al., 2000, 2002; DUTTA et al., 2002; TADDEI et al., 2005; MARONCLE et al., 2006; GUIGNOT et al., 2007; MOAL et al., 2011; VIEIRA et al., 2020) na promoção do acesso da bactéria à corrente sanguínea a partir do sítio de infecção. O dano tecidual provocado

por esta protease pode ocasionar danos endoteliais que permitiriam o contato do patógeno com o sangue e dessa forma, além de facilitar o desenvolvimento da infecção, sugere-se também que Sat possa atuar localmente na evasão ao sistema complemento do hospedeiro, ativado pela ocorrência do dano. Dessa forma, Sat desempenharia um duplo papel no estabelecimento da infecção.

Apenas a SPATE Pic foi avaliada até o momento em um modelo murino de sepse, com pequenas modificações feitas em relação ao protocolo aplicado no presente trabalho. Dutra et al. (2020) verificaram que a cepa ExPEC F5, isolada do sangue de um paciente com bacteremia e produtora de Pic ocasionou 100% de morte dos animais inoculados, enquanto todos os animais inoculados com a respectiva cepa mutante em *pic* sobreviveram. Ainda, houve diferença estatística entre as contagens de UFC/g dos órgãos analisados dos dois grupos, uma vez que contagens maiores foram observadas para a cepa selvagem. No entanto, o trabalho não avaliou a restauração do efeito observado na cepa selvagem através da complementação do gene deletado e as cepas foram inoculadas por via intraperitoneal, enquanto no presente estudo foi usada a via subcutânea conforme descrito por Picard et al. (1999). Assim como Sat, Pic possui ação proteolítica sobre outros substratos biológicos, que podem contribuir para o estabelecimento da infecção e do quadro de sepse.

Os resultados reunidos neste trabalho sugerem que Sat desempenha um importante papel no estabelecimento das ICS e na progressão para o quadro de sepse. Dessa forma, um modelo hipotético do papel de Sat na patogênese da sepse está apresentado na Figura 31, tomando por base os resultados experimentais obtidos neste projeto e os previamente publicados na literatura.

Figura 31 – Modelo hipotético do papel de Sat na patogênese da sepse causada por *E. coli*, considerando os dados experimentais existentes na literatura e obtidos no presente estudo.



(A) *E. coli* produtora de Sat presente no trato urinário ou no trato intestinal inicia a secreção de Sat, que provoca danos celulares na bexiga, rins ou intestino. Estes danos permitem o acesso aos vasos sanguíneos, cujas células endoteliais também sofrem a ação citotóxica de Sat. (B) Danos vasculares provocado por Sat permitem a entrada de *E. coli* na corrente sanguínea. (C) Secreção de Sat por *E. coli* presente no sangue confere proteção contra o sistema complemento, por meio da clivagem direta das proteínas C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9. Este mecanismo de evasão auxilia a multiplicação e disseminação de *E. coli* no sangue, de forma a atingir outros órgãos como rins, baço e fígado.

Finalmente, considerando a frequência expressiva de *sat* em cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia (PARHAM et al., 2005; ANANIAS; YANO, 2008; MAHJOUR-MESSAI et al., 2011; SKJØT-RASMUSSEN et al., 2012; MORA-RILLO et al., 2015; MIAJLOVIC et al., 2016; CLERMONT et al., 2017; HUNG et al., 2019; NOJOOI; GHASEMIAN, 2019; FREIRE et al., 2020; PARAMITA et al., 2020) e os resultados aqui apresentados, também é possível afirmar que Sat constitui um importante alvo para o desenvolvimento de vacinas e drogas anti-virulência, sejam de caráter preventivo ou terapêutico. Existem poucos protocolos estabelecidos para a prevenção de infecções por ExPEC além da antibioticoterapia profilática, que é cara e responsável pelo aumento da pressão seletiva. Ainda, o aumento da resistência bacteriana entre *E. coli* limita as opções de drogas que podem ser utilizadas tanto para a profilaxia quanto para o tratamento, encorajando o desenvolvimento de alternativas de prevenção não dependentes de antibióticos e novas estratégias de tratamento. Agentes anti-virulência podem contornar o problema da resistência bacteriana por meio do bloqueio dos fatores de virulência dos patógenos sem interferir nas suas vias metabólicas, que constituem o alvo tradicional das drogas atualmente em uso. Se utilizados unicamente ou em associação com antimicrobianos disponíveis, essas drogas podem eliminar infecções de uma forma patógeno específica bastante efetiva. Para tal, a constante caracterização do perfil de virulência de patógenos como *E. coli* para o estabelecimento de novos alvos de intervenção terapêutica se faz necessária e deve ser encorajada (SANNES et al., 2004; DICKEY; CHEUNG; OTTO, 2017).

6. CONCLUSÕES

Em resumo, no presente trabalho foi possível estabelecer que:

- a) Dentre os genes que codificam as serinoproteases da família SPATE, *sat* foi o gene mais frequentemente encontrado em cepas de *E. coli* isoladas de bacteremia humana isoladas entre 2000 e 2008 pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo;
- b) Foi possível purificar a proteína Sat em sua forma nativa e funcional, a partir do sobrenadante de cultura da cepa protótipo EC071, a qual apresentou ação proteolítica sobre as proteínas C2, C3, C3b, C4, C5, C6, C7, C8 e C9 do sistema complemento. Entretanto, Sat não foi unicamente responsável pelo fenótipo de resistência à ação bactericida do soro humano da cepa EC071.
- c) Sat foi relacionada ao estabelecimento e disseminação da infecção ocasionada pela cepa EC071 em um modelo murino de sepse.

Por tanto, conclui-se que Sat é um importante fator de virulência envolvido no desenvolvimento das ICS causadas por ExPEC, que além de desempenhar os efeitos citotóxicos já caracterizados na literatura, pode conferir também proteção contra o sistema imune do hospedeiro por meio da clivagem direta de proteínas do sistema complemento.

7. REFERÊNCIAS

- ABREU, A. G.; ABE, C. M.; NUNES, K. O.; MORAES, C. T. P.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; BARBOSA, A. S.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 7, p. 115–125, 2016.
- ABREU, A. G.; BARBOSA, A. S. How *Escherichia coli* circumvent complement-mediated killing. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 1–6, 2017.
- ABREU, A. G.; BUERIS, V.; PORANGABA, T. M.; SIRCILI, M. P.; NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* Strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 411–414, 2013.
- ABREU, A. G.; FRAGA, T. R.; GRANADOS MARTÍNEZ, A. P.; KONDO, M. Y.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S.; ELIAS, W. P. The serine protease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 212, p. 106–115, 2015.
- AGUERO, M. E.; ARON, L.; DELUCA, A. G.; TIMMIS, K. N.; CABELLO, F. C. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. **Infec. Immun.**, v. 46, p. 740–746, 1984.
- AL-HASANI, K.; HENDERSON, I. R.; SAKELLARIS, H.; RAJAKUMAR, K.; GRANT, T.; NATARO, J. P.; ROBINS-BROWNE, R.; ADLER, B. The *sigA* gene which is borne on the *she* pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infec. Immun.**, v. 68, p. 2457–2463, 2000.
- ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, p. 877–883, 2008.
- ANDRADE, F. B.; ABREU, A. G.; NUNES, K. O.; GOMES, T. A. T.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. Distribution of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Genet. Evol.**, v. 50, p. 83–86, jun. 2017.
- ANDRADE, F.B. **Interação da serino protease SepaA de *Escherichia coli* enteroagregativa com células epiteliais *in vitro***. 2019. 201f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.
- BEGHAIN, J.; BRIDIER-NAHMIAS, A.; NAGARD, H. Le; DENAMUR, E.; CLERMONT, O. ClermonTyping: An easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. **Microb. Genom.**, v. 4, p. 1–8, 2018.
- BÉLANGER, L.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 1–10, 2011.

- BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Mol. Microbiol.**, v. 17, p. 123–135, 1995.
- BERNSTEIN, H. D. Type V Secretion in Gram-negative bacteria. **EcoSal Plus.**, v. 8, 9. 1-10, 2019.
- BHARADWAJ, R.; BAL, A.; KAPILA, K.; MAVE, V.; GUPTA, A. Blood stream infections. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, p. 10–13, 2014.
- BIELASZEWSKA, M.; DOBRINDT, U.; GÄRTNER, J.; GALLITZ, I.; HACKER, J.; KARCH, H.; MÜLLER, D.; SCHUBERT, S.; ALEXANDER SCHMIDT, M.; SORSA, L. J.; ZDZIARSKI, J. Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 297, p. 625–639, 2007.
- BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV,I-K94. **Infec. Immun.**, v. 35, p. 654–659, 1982.
- BIRAN, D.; RON, E.Z. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. In: FRANKEL, G.; RON, E.Z. *Escherichia coli*, a versatile Pathogen. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 416, p. 149-162, 2018.
- BIRAN, D.; ROSENSHINE, I.; RON, E. Z. *Escherichia coli* O-antigen capsule (group 4) is essential for serum resistance. **Res. Microbiol.**, v. 171, p. 99–101, 2020.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic. Acids Res.**, v. 7, p. 1513–1523, 1979.
- BLÄTTNER, S.; DAS, S.; PAPROTKA, K.; EILERS, U.; KRISCHKE, M.; KRETSCHMER, D.; REMMELE, C. W.; DITTRICH, M.; MÜLLER, T.; SCHUELEIN-VOELK, C.; HERTLEIN, T.; MUELLER, M. J.; HUETTEL, B.; REINHARDT, R.; OHLSEN, K.; RUDEL, T.; FRAUNHOLZ, M. J. *Staphylococcus aureus* exploits a non-ribosomal cyclic dipeptide to modulate survival within epithelial cells and phagocytes. **PLoS Pathog.**, v. 12, p. 1–23, 2016.
- BOISEN, N.; RUIZ-PEREZ, F.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. Short Report: High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 294–301, 2009.
- BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A.; REDMAN, J. C.; PERSSON, S.; SIMON, J.; KOTLOFF, K. L.; LEVINE, M. M.; SOW, S.; TAMBOURA, B.; TOURE, A.; MALLE, D.; PANCHALINGAM, S.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. Genomic characterization of cnteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, p. 431–444, 2012.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2114–2120, 2014.
- BOLL, E. J.; OVERBALLE-PETERSEN, S.; HASMAN, H.; ROER, L.; NG, K.; SCHEUTZ, F.; HAMMERUM, A. M.; DUNGU, A.; HANSEN, F.; JOHANNESSEN, T. B.; JOHNSON, A.; NAIR, D. T.; LILJE, B.; HANSEN, D. S.; KROGFELT, K. A.; JOHNSON, T. J.; PRICE, L. B.; JOHNSON, J. R.; STRUVE, C.; OLESEN, B.; STEGGER, M. Emergence of enteroaggregative *Escherichia coli* within the ST131 lineage as a cause of extraintestinal infections. **mBio**, v. 11, p. 1–13, 2020.
- BONTEN, M.; JOHNSON, J. R.; VAN DEN BIGGELAAR, A. H. J.; GEORGALIS, L.;

- GEURTSSEN, J.; DE PALACIOS, P. I.; GRAVENSTEIN, S.; VERSTRAETEN, T.; HERMANS, P.; POOLMAN, J. T. Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: A systematic literature review. **Clin. Infect. Dis.**, p. 1–9, 2020.
- BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 767–778, 1997.
- CARLESSE, F.; CAPPELLANO, P.; QUILES, M. G.; MENEZES, L. C.; PETRILLI, A. S.; PIGNATARI, A. C. Clinical relevance of molecular identification of microorganisms and detection of antimicrobial resistance genes in bloodstream infections of paediatric cancer patients. **BMC Infect. Dis.**, v. 16, p. 1–8, 2016.
- CECCONI, M.; EVANS, L.; LEVY, M.; RHODES, A. Sepsis and septic shock. **Lancet**, v. 392, p. 75–87, 2018.
- CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infect. Genet. Evol.**, v. 12, p. 214–226, 2012.
- CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 1852–1858, 2006.
- CHRISTAKI, E.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. The complex pathogenesis of bacteremia: from antimicrobial clearance mechanisms to the genetic background of the host. **Virulence**, v. 5, p. 57–65, 2014.
- 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.
- CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 5, p. 58–65, 2013.
- CLERMONT, O.; COUFFIGNAL, C.; BLANCO, J.; MENTRÉ, F.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Two levels of specialization in bacteraemic *Escherichia coli* strains revealed by their comparison with commensal strains. **Epidemiol. Infect.**, v. 145, p. 872–882, 2017.
- CLERMONT, O.; DIXIT, O. V. A.; VANGCHHIA, B.; CONDAMINE, B.; DION, S.; BRIDIER-NAHMIA, A.; DENAMUR, E.; GORDON, D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environ. Microbiol.**, v. 21, p. 3107–3117, 2019.
- COSTA, T. R. D.; FELISBERTO-RODRIGUES, C.; MEIR, A.; PREVOST, M. S.; REDZEJ, A.; TROKTER, M.; WAKSMAN, G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 13, p. 343–359, 2015.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26–38, 2010.
- CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 822–880, 2013.
- DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **J. Infect.**, v. 71, p. 615–626, 2015.

DAUTIN, N. Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and function. **Toxins**, v. 2, p. 1179–1206, 2010.

DEL TORDELLO, E.; VACCA, I.; RAM, S.; RAPPUOLI, R.; SERRUTO, D. *Neisseria meningitidis* NaIP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 111, n. 1, p. 427–432, 2014.

DÍAZ, J. M.; DOZOIS, C. M.; AVELAR-GONZÁLEZ, F. J.; HERNÁNDEZ-CUELLAR, E.; POKHAREL, P.; DE SANTIAGO, A. S.; GUERRERO-BARRERA, A. L. The vacuolating autotransporter toxin (Vat) of *Escherichia coli* causes cell cytoskeleton changes and produces non-lysosomal vacuole formation in bladder epithelial cells. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 10, p. 1–12, 2020.

DICKEY, S. W.; CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 16, p. 457–471, 2017.

DOBRINDT, U. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 295, p. 357–371, 2005.

DRAGO-SERRANO, M. E.; GAVILANES PARRA, S.; ANGEL MANJARREZ-HERNÁNDEZ, H. EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 265, p. 35–40, 2006.

DURAND, E.; VERGER, D.; REGO, A. T.; CHANDRAN, V.; MENG, G.; FRONZES, R.; WAKSMAN, G. Structural biology of bacterial secretion systems in Gram-negative pathogens- Potential for new drug targets. **Infect. Disord. Drug Targets**, v. 9, p. 518–547, 2009.

DUTRA, I. L.; ARAÚJO, L. G.; ASSUNÇÃO, R. G.; LIMA, Y. A.; NASCIMENTO, J. R.; VALE, A. A. M.; ALVES, P. C. S.; TROVÃO, L. O.; SANTOS, A. C. M.; SILVA, R. M.; SILVA, L. A.; MACIEL, M. C. G.; DE SOUSA, E. M.; ELIAS, W. P.; NASCIMENTO, F. R. F.; ABREU, A. G. Pic-producing *Escherichia coli* induces high production of proinflammatory mediators by the host leading to death by sepsis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, p. 1–17, 2020.

DUTTA, P. R.; CAPPELLO, R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 7105–7113, 2002.

ELIAS, W. P.; CZEZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; TRABULSI, L. R.; NATARO, J. P. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1779–1785, 1999.

ERJAVEC, M. S.; ŽGUR-BERTOK, D. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans-the Trojan horse within our gut. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 362, p. 1–9, 2015.

ESCHERICH, T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1220–1225, 1988.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZEZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet , an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3155–3163, 1998.

FAN, E.; CHAUHAN, N.; GUPTA UDATHA, D. B. R. K.; LEO, J. C.; LINKE, D. Type V

- Secretion Systems in Bacteria. **Microbiol. Spectr.**, v. 4, p. 1–24, 2016.
- FERNÁNDEZ, F. J.; GÓMEZ, S.; VEGA, M. C. Pathogens' toolbox to manipulate human complement. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 85, p. 98–109, 2019.
- FRAGA, T. R.; COURROL, D. D. S.; CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; HIRATA, I. Y.; VASCONCELLOS, S. A.; JULIANO, L.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: The secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 6, p. 876–886, 2014.
- FREIRE, C. A.; SANTOS, A. C. M.; PIGNATARI, A. C.; SILVA, R. M.; ELIAS, W. P. Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) are largely distributed among *Escherichia coli* isolated from the bloodstream. **Braz. J. Microbiol.**, v. 51, p. 447–454, 2020.
- GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C. A.; GUTH, B. E. C.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, L. C. S.; MARTINEZ, M. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47, p. 3–30, 2016.
- GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial secretion systems: an overview. **Microbiol. Spectr.**, v. 4, p. 1–19, 2016.
- GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M.-H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 204–221, 2007.
- GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, p. 1072–1075, 2013.
- GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 53–66, 2000.
- GUYER, D. M.; RADULOVIC, S.; JONES, F.; MOBLEY, H. L. T. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4539–4546, 2002.
- HABOURIA, H.; POKHAREL, P.; MARIS, S.; GARÉNAUX, A.; BESSAIAH, H.; HOULE, S.; VEYRIER, F. J.; GUYOMARD-RABENIRINA, S.; TALARMIN, A.; DOZOIS, C. M. Three new serine-protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney. **Virulence**, v. 10, p. 568–587, 2019.
- HALLSTRÖM, T.; RIESBECK, K. *Haemophilus influenzae* and the complement system. **Trends Microbiol.**, v. 18, p. 258–265, 2010.
- HAVT, A.; LIMA, I. F.; MEDEIROS, P. H.; CLEMENTINO, M. A.; SANTOS, A. K.; AMARAL, M. S.; VERAS, H. N.; PRATA, M. M.; LIMA, N. L.; DI MOURA, A.; LEITE, Á. M.; SOARES, A. M.; FILHO, J. Q.; HOUPPT, E. R.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 89, p. 98–105, 2017.
- HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. 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.; NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infec. Immun.**, v. 69, p. 1231–1243, 2001.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 692–744, 2004.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 370–378, 1998.

HUNG, W. T.; CHENG, M. F.; TSENG, F. C.; CHEN, Y. S.; SHIN-JUNG LEE, S.; CHANG, T. H.; LIN, H. H.; HUNG, C. H.; WANG, J. L. Bloodstream infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: The role of virulence genes. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 52, p. 947–955, 2019.

ILAS. Instituto Latino Americano de Sepse. Programa de melhoria da qualidade Protocolos Gerenciados de Sepse, Relatório Aual. 2019.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat. Immunol.**, v. 16, p. 343–353, 2015.

JANG, J.; HUR, H. G.; SADOWSKY, M. J.; BYAPPANAHALLI, M. N.; YAN, T.; ISHII, S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications - a review. **J. Appl. Microbiol.**, v. 123, p. 570–581, 2017.

JENSEN, B. H.; POULSEN, A.; RASMUSSEN, S. H. R.; STRUVE, C.; ENGBERG, J. H.; FRIIS-MØLLER, A.; BOISEN, N.; JØNSSON, R.; PETERSEN, R. F.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K. A. Genetic virulence profile of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from danish children with either acute or persistent diarrhea. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 7, p. 1–15, 2017.

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, p. 3401–3407, 1993.

JOHNSON, J. R.; CLERMONT, O.; MENARD, M.; KUSKOWSKI, M. A.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. **J. Infect. Dis.**, v. 194, p. 1141–1150, 2006.

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B. D.; PORTER, S.; THURAS, P.; AZIZ, M.; PRICE, L. B. Accessory traits and phylogenetic background predict *Escherichia coli* extraintestinal virulence better than does ecological source. **J. Infect. Dis.**, v. 219, p. 121–132, 2019.

JOHNSON, J. R.; MURRAY, A. C.; GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.; KUSKOWSKI, M. a; SMITH, K. E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 2161–2168, 2003.

JOHNSON, J. R.; PORTER, S. B.; ZHANEL, G.; KUSKOWSKI, M. A.; DENAMUR, E. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. **Infec. Immun.**, v. 80, p. 1554–1562, 2012.

JOHNSON, J. R.; PORTER, S.; JOHNSTON, B.; KUSKOWSKI, M. A.; SPURBECK, R. R.; MOBLEY, H. L. T.; WILLIAMSON, D. A. Host characteristics and bacterial traits

predict experimental virulence for *Escherichia coli* bloodstream isolates from patients with urosepsis. **Open Forum Infect. Dis.**, v. 2, p. 1–9, 2015.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 139, p. 155–162, 2002.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus.**, v. 8, p. 1-32, 2018.

JUSKO, M.; POTEPA, J.; KANTYKA, T.; BIELECKA, E.; MILLER, H. K.; KALINSKA, M.; DUBIN, G.; GARRED, P.; SHAW, L. N.; BLOM, A. M. Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. **J. Innate Immun.**, v. 6, p. 31–46, 2014.

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

KERN, W. V.; RIEG, S. Burden of bacterial bloodstream infection — a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 26, p. 151–157, 2020.

KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 301, p. 642–647, 2011.

KOONTZ, L. TCA precipitation. **Methods. Enzymol.**, v. 541, p. 3–10, 2014.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 16–34, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LARA, F. B. M.; NERY, D. R.; DE OLIVEIRA, P. M.; ARAUJO, M. L.; CARVALHO, F. R. Q.; MESSIAS-SILVA, L. C. F.; FERREIRA, L. B.; FARIA-JUNIOR, C.; PEREIRA, A. L. 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. 1–11, 2017.

LATHEM, W. W.; BERGSBAKEN, T.; WELCH, R. A. Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. **J. Exp. Med.**, v. 199, n. 8, p. 1077–1087, 2004.

LAUPLAND, K. B.; CHURCH, D. L. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 27, p. 647–664, 2014.

LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. *E. coli* as an All-Rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. In: DOBRINDT, U.; HACKER, J.; SVANBORG, C. Between Pathogenicity and Commensalism. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 358, p 3-32, 2013.

LEYTON, D. L.; ROSSITER, A. E.; HENDERSON, I. R. From self sufficiency to dependence: Mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 10, p. 213–225, 2012.

LEYTON, D. L.; SLOAN, J.; HILL, R. E.; DOUGHTY, S.; HARTLAND, E. L. 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.

LI, W.; WEN, L.; LI, C.; CHEN, R.; YE, Z.; ZHAO, J.; PAN, J. Contribution of the outer membrane protein OmpW in *Escherichia coli* to complement resistance from binding to factor H. **Microb. Pathog.**, v. 98, p. 57–62, 2016.

LÓPEZ-LERA, A.; CORVILLO, F.; NOZAL, P.; REGUEIRO, J. R.; SÁNCHEZ-CORRAL, P.; LÓPEZ-TRASCASA, M. Complement as a diagnostic tool in immunopathology. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 85, p. 86–97, 2019.

LUBBERS, R.; VAN ESSEN, M. F.; VAN KOOTEN, C.; TROUW, L. A. Production of complement components by cells of the immune system. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 188, p. 183–194, 2017.

MACEDO, A. C. L.; ISAAC, L. Systemic lupus erythematosus and deficiencies of early components of the complement classical pathway. **Front. Immunol.**, v. 7, p. 1–7, 2016.

MACHADO, F. R.; CAVALCANTI, A. B.; BOZZA, F. A.; FERREIRA, E. M.; ANGOTTI CARRARA, F. S.; SOUSA, J. L.; CAIXETA, N.; SALOMAO, R.; ANGUS, D. C.; PONTES AZEVEDO, L. C. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An observational study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 17, p. 1180–1189, 2017.

MAHJOURB-MESSAI, F.; BIDET, P.; CARO, V.; DIANCOURT, L.; BIRAN, V.; AUJARD, Y.; BINGEN, E.; BONACORSI, S. *Escherichia coli* isolates causing bacteremia via gut translocation and urinary tract infection in young infants exhibit different virulence genotypes. **J. Infect. Dis.**, v. 203, n. 12, p. 1844–1849, 2011.

MAMANI, R.; FLAMENT-SIMON, S. C.; GARCÍA, V.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; LÓPEZ, C.; GARCÍA-MENIÑO, I.; DÍAZ-JIMÉNEZ, D.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Sequence types, clonotypes, serotypes, and virotypes of β -Lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteraemia in a Spanish hospital over a 12-year period (2000 to 2011). **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 1–11, 2019.

MANDOMANDO, I.; VUBIL, D.; BOISEN, N.; QUINTÓ, Li.; RUIZ, J.; SIGAÚQUE, B.; NHAMPOSSA, T.; GARRINE, M.; MASSORA, S.; AIDE, P.; NHACOLO, A.; PONS, M. J.; BASSAT, Q.; VILA, J.; MACETE, E.; SCHEUTZ, F.; LEVINE, M. M.; RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P.; ALONSO, P. L. *Escherichia coli* ST131 clones harbouring AggR and AAF/V fimbriae causing bacteremia in Mozambican children: Emergence of new variant of fimH27 subclone. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 14, p. 1–22, 2020.

MANGES, A. R.; GEUM, H. M.; GUO, A.; EDENS, T. J.; FIBKE, C. D.; PITOUT, J. D. D. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 32, p. 1–25, 2019.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Reservoirs of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol. Spectr.**, v. 3, p. 1–12, 2015.

MARKLAND, S. M.; LESTRANGE, K. J.; SHARMA, M.; KNIEL, K. E. Old friends in new places: Exploring the role of extraintestinal *E. coli* in intestinal disease and foodborne illness. **Zoonoses Public Health**, v. 62, p. 491–496, 2015.

MARONCLE, N. M.; SIVICK, K. E.; BRADY, R.; STOKES, F.; MOBLEY, H. L. T. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity and cellular targets of Secreted Autotransporter Toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infec. Immun.**, v. 74, p. 6124–6134, 2006.

MELLATA, M.; JOHNSON, J. R.; CURTISS, R. *Escherichia coli* isolates from

commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. **Zoonoses Public Health**, v. 65, p. 103–113, 2017.

MELLATA, M.; MITCHELL, N. M.; SCHÖDEL, F.; CURTISS, R.; PIER, G. B. Novel vaccine antigen combinations elicit protective immune responses against *Escherichia coli* sepsis. **Vaccine**, v. 34, p. 656–662, 2016.

MELLIES, J. L.; NAVARRO-GARCIA, F.; OKEKE, I.; FREDERICKSON, J.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. **Infec. Immun.**, v. 69, p. 315–324, 2001.

MENEZES, L. C.; ROCCHETTI, T. T.; BAUAB, K. de C.; CAPPELLANO, P.; QUILES, M. G.; CARLESSE, F.; DE OLIVEIRA, J. S. R.; PIGNATARI, A. C. C. Diagnosis by real-time polymerase chain reaction of pathogens and antimicrobial resistance genes in bone marrow transplant patients with bloodstream infections. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, 2013.

MERI, S. Self-nonsel self discrimination by the complement system. **FEBS Lett.**, v. 590, p. 2418–2434, 2016.

MERI, S.; PANGBURN, M. K. Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: Specificity of the polyanion binding site on factor H. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 198, p. 52-59, 1994. .

MERINO, I.; PORTER, S. B.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; CANTÓN, R.; JOHNSON, J. R. Molecularly defined extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* status predicts virulence in a murine sepsis model better than does virotype, individual virulence genes, or clonal subset among *E. coli* ST131 isolates. **Virulence**, v. 11, p. 327–336, 2020.

MERLE, N. S.; CHURCH, S. E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part I: molecular mechanisms of activation and regulation. **Front. Immunol.**, v. 6, p. 1–30, 2015a.

MERLE, N. S.; CHURCH, S. E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part II: role in immunity. **Front. Immunol.**, v. 6, p. 1-26, 2015b.

MEUSKENS, I.; SARAGLIADIS, A.; LEO, J. C.; LINKE, D. Type V secretion systems: An overview of passenger domain functions. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 1–19, 2019.

MIAJLOVIC, H.; COOKE, N. M.; MORAN, G. P.; ROGERS, T. R. F.; SMITH, S. G. Response of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* to human serum reveals a protective role for Rcs-regulated exopolysaccharide colanic acid. **Infec. Immun.**, v. 82, p. 298–305, 2014.

MIAJLOVIC, H.; MAC AOGÁIN, M.; COLLINS, C. J.; ROGERS, T. R.; SMITH, S. G. J. Characterization of *Escherichia coli* bloodstream isolates associated with mortality. **J. Med. Microbiol.**, v. 65, p. 71–79, 2016.

MIAJLOVIC, H.; SMITH, S. G. Bacterial self-defence: How *Escherichia coli* evades serum killing. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 354, p. 1–9, 2014.

MIRANDA-ESTRADA, L. I.; RUÍZ-ROSAS, M.; MOLINA-LÓPEZ, J.; PARRA-ROJAS, I.; GONZÁLEZ-VILLALOBOS, E.; CASTRO-ALARCÓN, N. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 35, p. 426–433, 2017.

MOAL, V. L.; COMENGE, Y.; RUBY, V.; AMSELLEM, R.; NICOLAS, V.; SERVIN, A. L. Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. **Cell. Microbiol.**, v. 13, p. 992–1013, 2011.

MOBLEY, H. L. T.; GREEN, D. M.; TRIFILLIS, A. L.; JOHNSON, D. E.; CHIPPENDALE, G. R.; LOCKATELL, C. V.; JONES, B. D.; WARREN, J. W. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: Role of hemolysin in some strains. **Infec. Immun.**, v. 58, p. 1281–1289, 1990.

MOMTAZ, H.; KARIMIAN, A.; MADANI, M.; DEHKORDI, F. S.; RANJBAR, R.; SARSHAR, M.; SSOUOD, N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 12, p. 1–12, 2013.

MORA, A.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; MAMANI, R.; MARZOA, J.; DION, S.; PICARD, B.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; DENAMUR, E.; BLANCO, J. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.

MORA-RILLO, M.; FERNÁNDEZ-ROMERO, N.; NAVARRO-SAN FRANCISCO, C.; DíEZ-SEBASTIÁN, J.; ROMERO-GÓMEZ, M. P.; FERNÁNDEZ, F. A.; LÓPEZ, J. R. A.; MINGORANCE, J. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. **Virulence**, v. 6, p. 93–100, 2015.

MORGAN, B. P.; BOYD, C.; BUBECK, D. Molecular cell biology of complement membrane attack. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 72, p. 124–132, 2017.

MOSTAFAVI, S. K. S.; NAJAR-PEERAYEH, S.; MOBAREZ, A. M.; PARIZI, M. K. Serogroup distribution, diversity of exotoxin gene profiles, and phylogenetic grouping of CTX-M-1- producing uropathogenic *Escherichia coli*. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 65, p. 148–153, 2019.

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

NOJOO MI, F.; GHASEMIAN, A. The relation of phylogroups, serogroups, virulence factors and resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from children with septicemia. **New Microbes New Infect.**, v. 29, p. 1–6, 2019.

NUNES, K. O.; SANTOS, A. C. P.; BANDO, S. Y.; SILVA, R. M.; GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. **Pathog. Dis.**, v. 75, p. 1–4, 2017.

NURK, S.; BANKEVICH, A.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; KOROBAYNIKOV, A.; LAPIDUS, A.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A.; SIROTKIN, A.; SIROTKIN, Y.; STEPANAUSKAS, R.; CLINGENPEEL, S. R.; WOYKE, T.; MCLEAN, J. S.; LASKEN, R.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. **J. Comput. Biol.**, v. 20, p. 714–737, 2013.

ORTH, D.; EHRLLENBACH, S.; BROCKMEYER, J.; KHAN, A. B.; HUBER, G.; KARCH, H.; SARG, B.; LINDNER, H.; WURZNER, R. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. **Infec. Immun.**, v. 78, p. 4294–4301, 2010.

- PARAMITA, R. I.; NELWAN, E. J.; FADILAH, F.; RENESTEEN, E.; PUSPANDARI, N.; ERLINA, L. Genome-based characterization of *Escherichia coli* causing bloodstream infection through next-generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 15, p. 1–13, 2020.
- PARHAM, N. J.; POLLARD, S. J.; DESVAUX, M.; SCOTT-TUCKER, A.; LIU, C.; FIVIAN, A.; HENDERSON, I. R. Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4076–4082, 2005.
- PARHAM, N. J.; SRINIVASAN, U.; DESVAUX, M.; FOXMAN, B.; MARRS, C. F.; HENDERSON, I. R. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, p. 73–83, 2004.
- PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. **Infec. Immun.**, v. 71, p. 5087–5096, 2003.
- PATEL, S. K.; DOTSON, J.; ALLEN, K. P.; FLECKENSTEIN, J. M. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infec. Immun.**, v. 72, p. 1786–1794, 2004.
- PENFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. **Gene**, v. 118, p. 145–146, 1992.
- PEREIRA, C. A. P.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; PIGNATARI, A. C. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R. P.; MEDEIROS, E. A. S.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; CARNEIRO, I.; BRITES, C.; REIS, M.; DE SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology and clinical features. **PLoS ONE**, v. 8, p. 8–13, 2013.
- PICARD, B.; GARCIA, J. S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infec. Immun.**, v. 67, p. 546–553, 1999.
- PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 1–7, 2012.
- POKHAREL, P.; DÍAZ, J. M.; BESSAIAH, H.; HOULE, S.; GUERRERO-BARRERA, A. L.; DOZOIS, C. M. The serine protease autotransporters TagB, TagC and Sha from extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are internalized by human bladder epithelial cells and cause actin cytoskeletal disruption. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, p. 1–23, 2020.
- POKHAREL, P.; HABOURIA, H.; BESSAIAH, H.; DOZOIS, C. M. Serine protease autotransporters of the enterobacteriaceae (SPATEs): Out and about and chopping it up. **Microorganisms**, v. 7, p. 1–28, 2019.
- PRASADARAO, N. V.; BLOM, A. M.; VILLOUTREIX, B. O.; LINSANGAN, L. C. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6352–6360, 2002.
- PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect Immun**, v. 62, p. 1369–1380, 1994.
- RAGUPATHI, N. K. D.; VEERARAGHAVAN, B.; SETHUVEL, D. P. M.; ANANDAN, S.; VASUDEVAN, K.; NEERAVI, A. R.; DANIEL, J. L. K.; SATHYENDRA, S.; IYADURAI, R.; MUTREJA, A. First Indian report on genome-wide comparison of multidrug-

resistant *Escherichia coli* from blood stream infections. **PLoS ONE**, v. 15, p. 1–12, 2020.

REIS, E. S.; MASTELLOS, D. C.; HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. D. New insights into the immune functions of complement. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 503–516, 2019.

RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M.-C.; DOZOIS, C. M. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 1553–1562, 2007.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol.**, v. 11, p. 785–797, 2010.

RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; TOURET, J.; TENAILLON, O.; LÓPEZ, E.; BOURDELIER, E.; COSTAS, C.; MATIC, I.; DENAMUR, E.; BLÁZQUEZ, J. High recombinant frequency in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. **Mol. Biol. Evol.**, v. 32, p. 1708–1716, 2015.

ROY, K.; KANSAL, R.; BARTELS, S. R.; HAMILTON, D. J.; SHAABAN, S.; FLECKENSTEIN, J. M. Adhesin degradation accelerates delivery of heat-labile toxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 29771–29779, 26 ago. 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.

RUIZ-PEREZ, F.; WAHID, R.; FAHERTY, C. S.; KOLAPPASWAMY, K.; RODRIGUEZ, L.; SANTIAGO, A.; MURPHY, E.; CROSS, A.; SZTEIN, M. B.; NATARO, J. P. 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.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 449–456, 2003.

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.

SABINO, S.; SOARES, S.; RAMOS, F.; MORETTI, M.; ZAVASCKI, A. P.; RIGATTO, M. H. A cohort study of the impact of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections on mortality of patients presenting with sepsis. **mSphere**, v. 4, p. 1–9, 2019.

SALOMÃO, R.; FERREIRA, B. L.; SALOMÃO, M. C.; SANTOS, S. S.; AZEVEDO, L. C. P.; BRUNIALTI, M. K. C. Sepsis: Evolving concepts and challenges. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 52, p. 1–14, 2019.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SANNES, M. R.; KUSKOWSKI, M. A.; OWENS, K.; GAJEWSKI, A.; JOHNSON, J. R. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. **J. Infect. Dis.**, v. 190, p. 2121–2128, 2004.

- SANTOS, A. C. de M.; SANTOS, F. F.; SILVA, R. M.; GOMES, T. A. T. Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 10, p. 1–11, 2020.
- SANTOS, A. C. M.; ZIDKO, A. C. M.; PIGNATARI, A. C.; SILVA, R. M. Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 46, p. 968–973, 2013.
- SAROWSKA, J.; FUTOMA-KOLOCH, B.; JAMA-KMIECIK, A.; FREJ-MADRZAK, M.; KSIAZCZYK, M.; BUGLA-PLOSKONSKA, G.; CHOROSZY-KROL, I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut Pathog.**, v. 11, p. 1–16, 2019.
- SCHMIDT, H.; ZHANG, W. L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P. I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6863–6873, 2001.
- SEEMANN, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.
- SERRE, K.; MOHR, E.; TOELLNER, K. M.; CUNNINGHAM, A. F.; GRANJEAUD, S.; BIRD, R.; MACLENNAN, I. C. M. Molecular differences between the divergent responses of ovalbumin-specific CD4 T cells to alum-precipitated ovalbumin compared to ovalbumin expressed by *Salmonella*. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 3558–3566, 2008.
- SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 264–292, 2005.
- SILVA, J. W. **Análise do potencial uropatogênico de *Escherichia coli* enteroagregativa**. 2020. 93f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.
- SIMON, R.; PROEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nat. Biotechnol.**, v. 1, p. 784–791, 1983.
- SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER, M.; BELLOMO, R.; BERNARD, G. R.; CHICHE, J.-D.; COOPERSMITH, C. M.; HOTCHKISS, R. S.; LEVY, M. M.; MARSHALL, J. C.; MARTIN, G. S.; OPAL, S. M.; RUBENFELD, G. D.; VAN DER POLL, T.; VINCENT, J.-L.; ANGUS, D. C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, p. 801–810, 2016.
- SINHA, M.; JUPE, J.; MACK, H.; COLEMAN, T. P.; LAWRENCE, S. M.; FRALEY, S. I. Emerging technologies for molecular diagnosis of Sepsis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 31, p. 1–26, 2018.
- SKJØT-RASMUSSEN, L.; EJRNÆS, K.; LUNDGREN, B.; HAMMERUM, A. M.; FRIMODT-MØLLER, N. Virulence factors and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from patients with bacteraemia of urinary tract origin relate to sex and hospital- vs. community-acquired origin. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 302, p. 129–134, jul. 2012.
- SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal Pathogenic

Escherichia coli. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 4, p. 134–163, 2007.

SPANO, L. C.; CUNHA, K. F.; MONFARDINI, M. V.; FONSECA, R. de C. B.; SCALETKY, I. C. A. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC Infect. Dis.**, v. 17, p. 1–9, 2017.

SUBASHCHANDRABOSE, S.; SMITH, S. N.; SPURBECK, R. R.; KOLE, M. M.; MOBLEY, H. L. T. Genome-wide detection of fitness genes in uropathogenic *Escherichia coli* during systemic infection. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2013.

SUKUPOLVI, S.; O'CONNOR, D. Amino acid alterations in a hydrophobic region of the TraT protein of R6-5 increase the outer membrane permeability of enteric bacteria. **Mol. Gen. Genet.**, v. 210, p. 178–180, 1987.

TADDEI, C. R.; FASANO, A.; FERREIRA, A. J. P.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 250, p. 263–269, 2005.

TADDEI, C. R.; MORENO, A. C. R.; FERNANDES FILHO, A.; MONTEMOR, L. P. G.; MARTINEZ, M. B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 227, p. 249–253, 2003.

TAPADER, R.; CHATTERJEE, S.; SINGH, A. K.; DAYMA, P.; HALDAR, S.; PAL, A.; BASU, S. The high prevalence of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) in *Escherichia coli* causing neonatal septicemia. **Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 33, p. 2015–2024, 2014.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 207–217, 2010.

THRELFALL, E. J.; ROWE, B.; FERGUSON, J. L.; WARD, L. R. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. **J. Hyg.**, v. 97: 419-426, 1986.

TOLOZA, L.; GIMÉNEZ, R.; FÁBREGA, M. J.; ALVAREZ, C. S.; AGUILERA, L.; CAÑAS, M. A.; MARTÍN-VENEGAS, R.; BADIA, J.; BALDOMÀ, L. The secreted autotransporter toxin (Sat) does not act as a virulence factor in the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **BMC Microbiol.**, v. 15, p. 1–15, 2015.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350–4354, 1979.

TSENG, Y. T.; WANG, S. W.; KIM, K. S.; YING-HSIANG WANG; YUFENG YAO; CHIEN-CHENG CHEN; CHI-WU CHIANG; PAO-CHUAN HSIEH; TENG, C. H. NlpI facilitates deposition of C4bp on *Escherichia coli* by blocking classical complement-mediated killing, which results in high-level bacteremia. **Infect. Immun.**, v. 80, p. 3669–3678, 2012.

USEIN, C.-R.; PAPAGHEORGHE, R.; OPREA, M.; CONDEI, M. Molecular characterization of bacteremic *Escherichia coli* isolates in Romania. **Folia Microbiol.**, v. 61, p. 6–11, 2015.

VAN DER POLL, T.; VAN DE VEERDONK, F. L.; SCICLUNA, B. P.; NETEA, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nat. Rev.**

Immunol., v. 17, p. 407–420, 2017.

VENDEMIATO, A. V. R.; VON NOWAKONSKI, A.; MARSON, F. A. de L.; LEVY, C. E. Microbiological characteristics of sepsis in a University hospital. **BMC Infect. Dis.**, v. 15, p. 1–7, 2015.

VIEIRA, P. C. G.; ESPINOZA-CULUPÚ, A. O.; NEPOMUCENO, R.; ALVES, M. R.; LEBRUN, I.; ELIAS, W. P.; RUIZ, R. C. Secreted autotransporter toxin (Sat) induces cell damage during enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **PLoS ONE**, v. 15, p. 1–23, 2020.

VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; RÖMLING, U.; DOBRINDT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C. G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, P.; RODRÍGUEZ-BANÑO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S. M. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 40, p. 437–463, 2016.

VILA, J.; SIMON, K.; RUIZ, J.; HORCAJADA, J. P.; VELASCO, M.; BARRANCO, M.; MORENO, A.; MENSA, J. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent?. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1039–1042, 2002.

VISCOLI, C. Bloodstream infections: The peak of the iceberg. **Virulence**, v. 7, p. 248–251, 2016.

WANG, C. Y.; WANG, S. W.; HUANG, W. C.; KIM, K. S.; CHANG, N. S.; WANG, Y. H.; WU, M. H.; TENG, C. H. Prc contributes to *Escherichia coli* evasion of classical complement-mediated serum killing. **Infec. Immun.**, v. 80, p. 3399–3409, 2012.

WASIŃSKI, B. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* – threat connected with food-borne infections. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 26, p. 532–537, 2019.

WHITFIELD, C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 75, p. 39–68, 2006.

WHO. World Health Organization. **Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis**. Seventieth World Health Assembly, 2017.

WOOSTER, D. G.; MARUVADA, R.; BLOM, A. M.; PRASADARAO, N. V. Logarithmic phase *Escherichia coli* K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4bp-mediated C3b and C4b degradation. **Immunology**, v. 117, p. 482–493, 2006.

YEN, Y. T.; KOSTAKIOTI, M.; HENDERSON, I. R.; STATHOPOULOS, C. Common themes and variations in serine protease autotransporters. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 370–379, 2008.

YOON, S. H.; PARK, Y. K.; KIM, J. F. PAIDB v2.0: Exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands. **Nucleic Acids Res.**, v. 43, p. D624–D630, 2015.

ZUDE, I.; LEIMBACH, A.; DOBRINDT, U. Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli*: What is the impact of phylogeny and pathotype? **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, p. 243–256, 2014.

ANEXOS

Anexo A

Pontuação dos sinais clínicos apresentados pelos animais no modelo murino de sepse.


Fonte: Blättner et al., 2016. Material suplementar 6.

Observation		Score points
I Body weight		
- No change		0
- Loss of body weight in % = score points; e.g. loss of body weight 8% = 8 points		1-20
- Loss of body weight $\geq 20\%$		20
II General conditions		
Fur		
- Shining		0
- Matte		2
- Ruffled		4
Eyes		
- Clear and clean		0
- Unclean and sticky, closed or semi-closed		3
Posture		
- Normal		0
- Hunched		10
- Massively hunched		20
Clinical complications		
- Tension, paralysis, tremor		20
- Breath noises		20
- Animal feels cold to the touch		20
III Motility		
- Spontaneous (normal behavior, social contacts)		0
- Spontaneous but reduced		1
- Moderately reduced activity		2
- Motility only after stimulation		5
- Isolation, lethargy, coordination disorders		10
- Self-mutilation, aggression		20
IV Respiration		
- Breathing normal		0
- Breathing slightly changed		1
- Accelerated breathing + 30% (tachypnoea)		10
- Strongly accelerated breathing + 50%		20
Rating	measures	Sum score pts
Severity level 0	no burden on animals, animals healthy	0-3
Severity level 1	low burden on animals, low sickness, animals are observed	4-9
Severity level 2	moderate burden on animals, moderate sickness, animals are carefully observed	10-15
Severity level 3	moderate to severe burden on animals, moderate to severe sickness, animals are carefully observed, abort of experiment if necessary	16-20
Severity level 4	severe burden on animals, animals moribund, implementation of humane endpoint, abort of experiment	>20

Anexo B

Análises de bioinformática realizadas no genoma da cepa EC071: sorotipagem e determinação do ST.

17/05/2019 Center for Genomic Epidemiology - Results

Center for Genomic Epidemiology 

Home Services Instructions Output Overview of genes Article abstract

SerotypeFinder-2.0 Server - Results

Database(s): *H_type,O_type*

Database for H type genes							
Gene	Serotype	Identity	Template / HSP length	Contig	Position in contig	Accession number	
fliC	H7	100	1758 / 1758	NODE_5_length_142951_cov_40.3524	72740..74497	AF228492	

Database for O type genes							
Gene	Serotype	Identity	Template / HSP length	Contig	Position in contig	Accession number	
wzx	O1	99.92	1227 / 1227	NODE_28_length_66413_cov_38.907	2846..4072	GU299791	

[extended output](#)


Results as text Results tsv Hits in genome seqs Serotype gene sequences

Selected %ID threshold: 85 %

Selected minimum length: 60 %

Input Files: 22181_EC-071.fasta

17/05/2019 MLST - Typing Results

Center for Genomic Epidemiology 

Home Services Instructions Output

MLST-2.0 Server - Results

mlst Profile: *ecoli*

Organism: *Escherichia coli*#1

Sequence Type: 59

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_27
fumC	100	100	469	469	0	fumC_32
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_24
icd	100	100	518	518	0	icd_29
mdh	100	100	452	452	0	mdh_26
purA	100	100	478	478	0	purA_19
recA	100	100	510	510	0	recA_22

[extended output](#)

Input Files: 22181_EC-071.fasta

Anexo B

Análises de bioinformática realizadas no genoma da cepa EC071: verificação da presença de plasmídeos e determinação do filogruppo.

26/11/2020 Center for Genomic Epidemiology - Results

Center for Genomic Epidemiology

[Home](#) [Services](#) [Instructions](#) [Output](#)

PlasmidFinder-2.0 Server - Results

Organism(s): *Enterobacteriaceae*

Plasmid	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
Col(MP18)	100	193 / 193	NODE_119_length_2457_cov_2129.19	961..1153		NC013652
Col156	97.4	154 / 154	NODE_91_length_7575_cov_866.065	6311..6464		NC009781
Col8282	100	207 / 207	NODE_105_length_4218_cov_1895.55	2166..2372		DQ995352
IncB/O/K/Z	96.69	151 / 151	NODE_65_length_21610_cov_14.0442	7873..8023		CU928147
IncX1	98.66	374 / 374	NODE_48_length_35278_cov_61.936	27511..27884		EU370913

17/06/2019 ClermonTyping - About

This is the results of your analysis 71-17062019_113208

This link is only active for 1 day.
Having some issue about the results? Check out the Help section (/help)!

ClermonTyping Report

Date: Mon Jun 17 23:32:25 2019

file	quadruplex	supp	phylogroup	mash_group
22181_EC-071.fasta	- + - -		F	F

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Sistemas de captação de ferro	AE014075.1	<i>E. coli</i> CFT073 (UPEC)	<i>chuS</i>	c4307	+
			<i>chuA</i>	c4308	+
			<i>chuT</i>	c4313	+
			<i>chuW</i>	c4314	+
			<i>chuX</i>	c4315	+
			<i>chuY</i>	c4316	+
			<i>chuU</i>	c4317	+
			<i>chuV</i>	c4318	+
			<i>cirA</i>	c2690	+
			<i>entD</i>	c0668	+
			<i>fepA</i>	c0669	+
			<i>fes</i>	c0671	+
			<i>entF</i>	c0673	+
			<i>fepE</i>	c0674	+
			<i>fepC</i>	c0675	+
			<i>fepG</i>	c0676	+
			<i>fepD</i>	c0677	+
			<i>entS</i>	c0678	+
			<i>fepB</i>	c0679	+
			<i>entC</i>	c0680	+
			<i>entE</i>	c0681	+
			<i>entB</i>	c0682	+
			<i>entA</i>	c0683	+
			<i>fiu</i>	c0890	+
			<i>hma</i>	c2482	+
			<i>ireA</i>	c5174	-
			<i>iroN</i>	c1250	-
			<i>iroE</i>	c1251	-
			<i>iroD</i>	c1252	-
			<i>iroC</i>	c1253	-
			<i>iroB</i>	c1254	-
			<i>iucA</i>	c3627	-
			<i>iucB</i>	c3626	-
			<i>iucC</i>	c3625	-
			<i>iucD</i>	c3624	-
			<i>iutA</i>	c3623	-
<i>shiF</i>	c3628	-			
<i>ybtS</i>	c2419	+			
<i>ybtX</i>	c2420	+			
<i>ybtQ</i>	c2421	+			
<i>ybtP</i>	c2422	+			
<i>ybtA</i>	c2423	+			
<i>irp2</i>	c2424	+			
<i>irp1</i>	c2429	+			
<i>ybtU</i>	c2430	+			
<i>ybtT</i>	c2432	+			
<i>ybtE</i>	c2433	+			
<i>fyuA</i>	c2436	+			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071		
Sistemas de captação de ferro	NC_007941.1	<i>E. coli</i> UTI89	<i>cjrA</i>	UTI89_RS25295	-		
			<i>cjrB</i>	UTI89_RS25300	-		
			<i>cjrC</i>	UTI89_RS25305	-		
	NC_017626.1	<i>E. coli</i> 042	<i>efeU</i>	EC042_1093	+		
			<i>efeO</i>	EC042_1094	+		
			<i>efeB</i>	EC042_1095	+		
			<i>fitR</i>	EC042_3315	+		
			<i>fitE</i>	EC042_3316	+		
			<i>fitD</i>	EC042_3317	+		
			<i>fitC</i>	EC042_3318	+		
			<i>fitB</i>	EC042_3319	+		
			<i>fitA</i>	EC042_3320	+		
			<i>sitD</i>	EC042_1518	+		
			<i>sitC</i>	EC042_1519	+		
			<i>sitB</i>	EC042_1520	+		
			<i>sitA</i>	EC042_1521	+		
			NC_009837.1	<i>E. coli</i> APEC O1 plasmídeo pAPEC-O1-CoIBM	<i>eitA</i>	APECO1_RS26195	-
					<i>eitB</i>	APECO1_RS26190	-
	<i>eitC</i>	APECO1_RS26185			-		
	NC_002695.2	<i>E. coli</i> EDL933	<i>fbpC</i>	ECs_0413	-		
			<i>fbpB</i>	ECs_0414	-		
			<i>fbpA</i>	ECs_0415	-		
			<i>fecE</i>	b4287	+		
			<i>fecD</i>	b4288	+		
			<i>fecC</i>	b4289	+		
			<i>fecB</i>	b4290	+		
			<i>fecA</i>	b4291	+		
			<i>fecR</i>	b4292	+		
			<i>fecl</i>	b4293	+		
			<i>feoA</i>	b3408	+		
			<i>feoB</i>	b3409	+		
			<i>feoC</i>	b3410	+		
<i>fhuA</i>			b0150	+			
<i>fhuC</i>			b0151	+			
<i>fhuD</i>	b0152	+					
<i>fhuB</i>	b0153	+					
<i>fhuE</i>	b1102	+					
<i>fhuF</i>	b4367	+					

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Autotransportadoras	HM143900.1	<i>E. coli</i> DE205	<i>aatA</i>	-	+
	X65022.1	<i>E. coli</i> 2787	<i>aidA</i>	-	-
	NC_013008.1	<i>E. coli</i> TW14359	<i>cah</i>	ECSP_RS06795	+
	NC_011745.1	<i>E. coli</i> O81 ED1a	<i>eaaA</i>	ECED1_RS12585	-
	NC_009790.1	<i>E. coli</i> E24377A	<i>eatA</i>	ECE24377A_RS01490	-
	NC_002655.2	<i>E. coli</i> EDL933	<i>ehaA</i>	Z_RS01845	-
			<i>ehaB</i>	Z_RS02155	+
			<i>ehaC</i>	Z_RS16420	+
			<i>ehaD</i>	Z_RS28850	+
			<i>ehaG</i>	Z_RS23640	+
	NC_007414.1	<i>E. coli</i> EDL933 plasmídeo pO157	<i>espP</i>	Z_RS28340	-
	NC_011601.1	<i>E. coli</i> E2348/69	<i>ehaJ</i>	E2348C_RS15585	-
	NC_011745.1	<i>E. coli</i> O81 ED1a	<i>eibA</i>	ECED1_RS08525	-
	AF151674.1	<i>E. coli</i> ECOR-9	<i>eibC</i>	-	-
	AF151675.1		<i>eibD</i>	-	-
	AF151676.1		<i>eibE</i>	-	-
	AF399847.1		<i>eibF</i>	-	-
	GU295813.1		<i>eibG</i>	-	-
	AY258503.2	<i>E. coli</i> EH41 plasmídeo pO113	<i>epeA</i>	-	-
	NC_011601.1	<i>E. coli</i> E2348/69	<i>espC</i>	E2348C_RS15640	-
	AJ278144.1	<i>E. coli</i> 4797/97	<i>espl</i>	-	-
	NC_017724.1	<i>E. coli</i> H10407 plasmídeo p948	<i>etpA</i>	ETEC_RS30895	-
			<i>etpB</i>	ETEC_RS26575	-
	NZCP009166.1	<i>E. coli</i> 1303	<i>flu_1</i>	EC1303_RS04590	+
			<i>flu_2</i>	EC1303_RS05750	+
	NC_007607.1	<i>S. dysenteriae</i> Sd197 plasmídeo pSD1_197	<i>icsA</i>	SDY_RS24120	-
	NC_011748.1	<i>E. coli</i> 55989	<i>sigA</i>	EC55989_RS23905	+
			<i>pic</i>	EC55989_RS16860	-
	A399919.3	<i>E. coli</i> 98NK2 plasmídeo pO113	<i>saa</i>	-	-
			<i>sat</i>	c3619	+
	AE014075.1	<i>E. coli</i> CFT073	<i>upaG</i>	c4424	+
			<i>vat</i>	c0393	-
			<i>tsh</i>	APECO1_RS26050	-
	NC_009837.1	<i>E. coli</i> APEC O1 Plasmídeo pAPEC-O1-ColBM	<i>tsh</i>	APECO1_RS26050	-
	CP000247.1	<i>E. coli</i> 536	<i>upaB</i>	-	-
	NC_008253.1		<i>upaC</i>	ECP_RS02160	+
	CP000247.1		<i>upaH</i>	ECP_1410	-
	NC_008253.1		<i>upaI</i>	ECP_RS11585	+
	NC_008253.1		<i>upaJ</i>	ECP_RS18865	+
	NC_017628.1		<i>E. coli</i> IHE3034	<i>vat</i>	ECOK1_RS01405
NC_017627.1	<i>E. coli</i> 042 plasmídeo pAA		<i>pet</i>	EC042_RS26410	+

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Toxinas	CP009166	<i>E. coli</i> 1303	<i>astA</i>	EC1303_c38650	-
	U03293	<i>E. coli</i> O86:H34 E6468/62	<i>cdtA-I</i>	-	-
			<i>cdtB-I</i>	-	-
			<i>cdtC-I</i>	-	-
	U04208	<i>E. coli</i> 9142-88	<i>cdtA-II</i>	-	-
			<i>cdtB-II</i>	-	-
			<i>cdtC-II</i>	-	-
	U89305	<i>E. coli</i> S5	<i>cdtA-III</i>	-	-
			<i>cdtB-III</i>	-	-
			<i>cdtC-III</i>	-	-
	AY578329	<i>E. coli</i> 28C	<i>cdtA-IV</i>	-	-
			<i>cdtB-IV</i>	-	-
			<i>cdtC-IV</i>	-	-
	AJ508930	<i>E. coli</i> 493/89	<i>cdtA-V</i>	-	-
			<i>cdtB-V</i>	-	-
			<i>cdtC-V</i>	-	-
	X87835	<i>E. coli</i> ECOR-5	<i>cfa</i>	-	-
	X82682	<i>E. coli</i> PTE10	<i>cta</i>	-	-
	DQ381420	<i>E. coli</i> APEC O1 plasmídeo pAPEC-O1- ColBM	<i>cba</i>	APECO1_O1Co BM120	-
			<i>cbi</i>	APECO1_O1Co BM119	-
	M16816.1	<i>E. coli</i>	<i>cba</i>	-	-
	CP000972.1	<i>E. coli</i> SMS-3-5 plasmídeo pSMS35_8	<i>cea</i>	EcSMS35_B000 7	+
	NC_011747.1	<i>E. coli</i> S88 plasmídeo pECOS88	<i>cia</i>	ECS88_RS0056 0	-
			<i>imm</i>	ECS88_RS0056 5	-
	AY258503.2	<i>E. coli</i> EH41	<i>cib</i>	LH0107	-
	X87834.1	<i>E. coli</i> K49	<i>cka</i>	-	-
	DQ381420.1	<i>E. coli</i> APEC O1 plasmídeo pAPEC-O1- ColBM	<i>cma</i>	APECO1_O1Co BM118	-
			<i>cmi</i>	APECO1_O1Co BM117	-
	Y00533.1	<i>E. coli</i>	<i>cna</i>	-	-
	Y18684.1	<i>E. coli</i>	<i>csa</i>	-	-
	AY545598.5	<i>E. coli</i> O2 APEC A2363 plasmídeo pAPEC-O2- ColV	<i>cvaA</i>	O2ColV63	-
			<i>cvaB</i>	O2ColV64	-
			<i>cvaC</i>	O2ColV65	-
			<i>cvi</i>	O2ColV66	-
	AF197335.1	<i>E. coli</i>	<i>colY</i>	-	-
	AM229678.1	<i>E. coli</i> IHE3034	<i>clbQ</i>	-	-
	X70670.1	<i>E. coli</i> E-B35	<i>cnf1</i>	-	-
	U01097.1	<i>E. coli</i> S5	<i>cnf2</i>	-	-
	AM263062.1	<i>E. coli</i> C48a	<i>cnf3</i>	-	-
	NC_017722.1	<i>E. coli</i> H10407	<i>eltA</i>	-	-
<i>eltB</i>			-	-	
AB252836.1	<i>E. coli</i> ngsk-EC2e	<i>stx2eA</i>	-	-	
		<i>stx2eB</i>	-	-	
AB232172.1	<i>E. coli</i> ngsk02014	<i>stx2fA</i>	-	-	
		<i>stx2fB</i>	-	-	

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Toxinas	NC_017722.1	<i>E. coli</i> H10407	<i>estla</i>	EPEC_RS29410	-
			<i>clbP</i>	-	-
			<i>clbO</i>	-	-
			<i>clbN</i>	-	-
			<i>clbM</i>	-	-
			<i>clbL</i>	-	-
			<i>clbK</i>	-	-
			<i>clbJ</i>	-	-
			<i>clbI</i>	-	-
	AM229678.1	<i>E. coli</i> IHE3034	<i>clbH</i>	-	-
			<i>clbG</i>	-	-
			<i>clbF</i>	-	-
			<i>clbE</i>	-	-
			<i>clbD</i>	-	-
			<i>clbC</i>	-	-
			<i>clbB</i>	-	-
			<i>clbR</i>	-	-
			<i>clbA</i>	-	-
	NC_002128.1	<i>E. coli</i> Sakai plasmídeo pO157	<i>hlyC</i>	pO157p17	-
			<i>hlyA</i>	pO157p18	-
			<i>hlyB</i>	pO157p19	-
			<i>hlyD</i>	pO157p20	-
	CP000247.1	<i>E. coli</i> 536	<i>hlyC</i>	ECP_3826	-
			<i>hlyA</i>	ECP_3827	-
			<i>hlyB</i>	ECP_3828	-
			<i>hlyD</i>	ECP_3829	-
			<i>usp</i>	ECP_0113	+
	NC_000913.3	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	<i>hlyE</i>	b1182	+
	DQ381420.1	<i>E. coli</i> APEC O1 plasmídeo pAPEC-O1-ColBM	<i>hlyF</i>	APECO1_O1Co BM189	-
			<i>mchX</i>	-	-
			<i>mchI</i>	-	-
			<i>mchB</i>	-	-
			<i>mchC</i>	-	-
AJ515251.1	<i>E. coli</i> CA46	<i>mchD</i>	-	-	
		<i>mchE</i>	-	-	
		<i>mchF</i>	-	-	
		<i>mcml</i>	-	-	
		<i>mcmA</i>	-	-	
		<i>mcmM</i>	-	-	
CP000244.1	<i>E. coli</i> UTI89	<i>senB</i>	UTI89_P030	-	
AF074613.1		<i>stcE</i>	Z_L7031	-	
CP008957.1	<i>E. coli</i> EDL933	<i>stx1A</i>	Z3343	-	
CP008957.1		<i>stx1B</i>	Z3344	-	
AJ312232.1	<i>E. coli</i> 3115/97	<i>stx1cA</i>	-	-	
		<i>stx1cB</i>	-	-	
AE005174.2	<i>E. coli</i> EDL933	<i>stx2A</i>	Z1464	-	
		<i>stx2B</i>	Z1465	-	
EU086525.1	<i>E. coli</i> 06-5121	<i>stx2cA</i>	-	-	
		<i>stx2cB</i>	-	-	
AF479828.1	<i>E. coli</i> B2F1	<i>stx2dA</i>	-	-	
		<i>stx2dB</i>	-	-	

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Pilus do tipo IV	FM180569.1	<i>E. coli</i> E2348/69	<i>bfpA</i>	E2348_P1_003	-
			<i>bfpG</i>	E2348_P1_004	-
			<i>bfpB</i>	E2348_P1_005	-
			<i>bfpC</i>	E2348_P1_006	-
			<i>bfpU</i>	E2348_P1_007	-
			<i>bfpD</i>	E2348_P1_008	-
			<i>bfpE</i>	E2348_P1_009	-
			<i>bfpF</i>	E2348_P1_010	-
			<i>bfpP</i>	E2348_P1_011	-
			<i>bfpH</i>	E2348_P1_012	-
			<i>bfpI</i>	E2348_P1_013	-
			<i>bfpJ</i>	E2348_P1_014	-
			<i>bfpK</i>	E2348_P1_015	-
			<i>bfpL</i>	E2348_P1_016	-
			<i>cofR</i>	-	-
			<i>cofS</i>	-	-
	<i>cofT</i>	-	-		
	<i>cofA</i>	-	-		
	<i>cofB</i>	-	-		
	<i>cofC</i>	-	-		
	<i>cofD</i>	-	-		
	<i>cofE</i>	-	-		
	<i>cofF</i>	-	-		
	<i>cofG</i>	-	-		
	<i>cofH</i>	-	-		
	<i>cofI</i>	-	-		
	<i>cofJ</i>	-	-		
	<i>cofP</i>	-	-		
	<i>IngX1</i>	-	-		
	<i>IngR</i>	-	-		
	<i>IngS</i>	-	-		
	<i>IngT</i>	-	-		
	<i>IngX2</i>	-	-		
	<i>IngA</i>	-	-		
	<i>IngB</i>	-	-		
	<i>IngC</i>	-	-		
	<i>IngD</i>	-	-		
	<i>IngE</i>	-	-		
	<i>IngF</i>	-	-		
	<i>IngG</i>	-	-		
	<i>IngH</i>	-	-		
	<i>IngI</i>	-	-		
	<i>IngJ</i>	-	-		
	<i>IngP</i>	-	-		

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Sistema de secreção do tipo VI	CP010344.1	<i>E. coli</i> ECC-1470	<i>impA</i>	E1470_c02190	-
			<i>etsI</i>	E1470_c02200	-
			<i>etsA</i>	E1470_c02210	-
			<i>etsX</i>	E1470_c02220	-
			<i>etsV</i>	E1470_c02230	-
			<i>etsU</i>	E1470_c02240	-
			<i>etsM</i>	E1470_c02250	-
			<i>etsN</i>	E1470_c02260	-
			<i>etsH</i>	E1470_c02270	-
			<i>etsR</i>	E1470_c02280	-
			<i>etsC</i>	E1470_c02290	-
			<i>etsD</i>	E1470_c02300	-
			<i>etsB</i>	E1470_c02310	-
			<i>etsS</i>	E1470_c02330	-
			<i>etsG</i>	E1470_c02350	-
			<i>yhhL_1</i>	E1470_c02390	-
			FN554766.1	<i>E. coli</i> 042 (EAEC)	<i>aaiA</i>
	<i>aaiB</i>	EC042_4563			-
	<i>aaiC</i>	EC042_4564			-
	<i>aaiD</i>	EC042_4565			-
	<i>aaiE</i>	EC042_4566			-
	<i>aaiF</i>	EC042_4568			-
	<i>vgrG</i>	EC042_4569			-
	<i>aaiH</i>	EC042_4570			-
	<i>aaiI</i>	EC042_4571			-
	<i>aaiJ</i>	EC042_4572			-
	<i>aaiK</i>	EC042_4573			-
	<i>aaiL</i>	EC042_4574			-
	<i>aaiM</i>	EC042_4574A			-
	<i>aaiN</i>	EC042_4575			-
	<i>icmF</i>	EC042_4576			-
	<i>clpV</i>	EC042_4577			-
	<i>aaiS</i>	EC042_4580	-		
<i>aaiT</i>	EC042_4581	-			
<i>aaiU</i>	EC042_4582	-			
<i>aaiV</i>	EC042_4583	-			
<i>aaiW</i>	EC042_4584	+			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Sistema de secreção do tipo VI	CP008957.1	<i>E. coli</i> EDL933	<i>icmF</i>	Z0250	-
			<i>clpV</i>	Z0254	-
			<i>hcp</i>	Z0266	-
			<i>vgrG</i>	Z0267	-
	CP000468.1	<i>E. coli</i> APEC O1	<i>aec28</i>	APECO1_1768	-
			<i>aec29</i>	APECO1_1769	-
			<i>aec30</i>	APECO1_1770	-
			<i>aec31</i>	APECO1_1771	-
			<i>aec32</i>	APECO1_1772	-
			<i>aec14</i>	APECO1_1755	-
			<i>aec11</i>	APECO1_1752	-
			<i>aec8</i>	APECO1_1750	-
			<i>aec7</i>	APECO1_1749	-
			<i>aec26</i>	APECO1_1766	-
			<i>aec25</i>	APECO1_1765	-
			<i>aec24</i>	APECO1_1764	-
			<i>aec23</i>	APECO1_1763	-
			<i>aec22</i>	APECO1_1762	-
			<i>aec19</i>	APECO1_1760	-
			<i>aec18</i>	APECO1_1759	-
			<i>aec17</i>	APECO1_1758	-
			<i>aec16</i>	APECO1_1757	-
			<i>aec15</i>	APECO1_1756	-
			<i>aec27</i>	APECO1_1767	-

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Sistema de secreção do tipo III	FM180568.1	<i>E. coli</i> E2348/69	<i>espG1</i>	E2348C_3970	-
			<i>ler</i>	E2348C_3968	-
			<i>escR</i>	E2348C_3963	-
			<i>escS</i>	E2348C_3962	-
			<i>escU</i>	E2348C_3960	-
			<i>escT</i>	E2348C_3961	-
			<i>grlA</i>	E2348C_3957	-
			<i>grlR</i>	E2348C_3958	-
			<i>escV</i>	E2348C_3949	-
			<i>mpc</i>	E2348C_3950	-
			<i>espZ</i>	E2348C_3951	-
			<i>orf8</i>	E2348C_3952	-
			<i>escJ</i>	E2348C_3953	-
			<i>sepD</i>	E2348C_3954	-
			<i>escC</i>	E2348C_3955	-
			<i>cesD</i>	E2348C_3956	-
			<i>escN</i>	E2348C_3948	-
			<i>sepQ</i>	E2348C_3945	-
			<i>cesF</i>	E2348C_3943	-
			<i>espH</i>	E2348C_3944	-
			<i>map</i>	E2348C_3942	-
			<i>tir</i>	E2348C_3941	-
			<i>cesT</i>	E2348C_3940	-
			<i>escD</i>	E2348C_3938	-
			<i>speL</i>	E2348C_3937	-
			<i>espA</i>	E2348C_3936	-
			<i>espD</i>	E2348C_3935	-
			<i>espB</i>	E2348C_3934	-
			<i>espF</i>	E2348C_3930	-
			<i>escF</i>	E2348C_3932	-
			<i>cesD2</i>	E2348C_3933	-
			<i>nleB1</i>	E2348C_3231	-
			<i>nleE1</i>	E2348C_3232	-
			<i>espL2</i>	E2348C_3230	-
			<i>espG2</i>	E2348C_2916	-
			<i>nleF</i>	E2348C_1445	-
			<i>nleH2</i>	E2348C_1444	-
			<i>nleA</i>	E2348C_1442	-
			<i>nleE2</i>	E2348C_1080	-
			<i>nleD</i>	E2348C_1044	-
<i>nleC</i>	E2348C_1042	-			
<i>nleB2</i>	E2348C_1041	-			
<i>espJ</i>	E2348C_0723	-			
<i>nleG</i>	E2348C_1040	-			
<i>nleH1</i>	E2348C_0718	-			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Sistema de secreção do tipo III	CP008957.1	<i>E. coli</i> EDL933	<i>espX4</i>	Z5636	+
			<i>espX5</i>	Z5665	-
			<i>espX6</i>	Z5935	-
			<i>espL4</i>	Z5608	-
			<i>espY4</i>	Z5211	+
			<i>espG</i>	Z5142	-
			<i>escE</i>	Z5139	-
			<i>ler</i>	Z5140	-
			<i>cesAB</i>	Z5138	-
			<i>orf4</i>	Z5137	-
			<i>escL</i>	Z5136	-
			<i>escR</i>	Z5135	-
			<i>escS</i>	Z5134	-
			<i>escT</i>	Z5133	-
			<i>etgA</i>	Z5131	-
			<i>escU</i>	Z5132	-
			<i>cesD</i>	Z5127	-
			<i>grlR</i>	Z5129	-
			<i>sepD</i>	Z5125	-
			<i>escC</i>	Z5126	-
			<i>escJ</i>	Z5124	-
			<i>orf12</i>	Z5121	-
			<i>escV</i>	Z5120	-
			<i>escN</i>	Z5119	-
			<i>orf15</i>	Z5118	-
			<i>cesF</i>	Z5114	-
			<i>espH</i>	Z5115	-
			<i>sepQ</i>	Z5116	-
			<i>map</i>	Z5113	-
			<i>tir</i>	Z5112	-
			<i>cesT</i>	Z5111	-
			<i>eae</i>	Z5110	-
			<i>escD</i>	Z5109	-
			<i>sepL</i>	Z5108	-
			<i>espA</i>	Z5107	-
			<i>espD</i>	Z5106	-
			<i>espB</i>	Z5105	-
			<i>orf29</i>	Z5102	-
			<i>escF</i>	Z5103	-
			<i>cesD2</i>	Z5104	-
			<i>nleE</i>	Z4329	-
			<i>espF</i>	Z5100	-
<i>nleB1</i>	Z4328	-			
<i>espL2</i>	Z4326	-			
<i>espW</i>	Z3920	-			
<i>espM2</i>	Z3918	-			
<i>espR4</i>	Z3026	-			
<i>espJ</i>	Z3071	-			
<i>espR3</i>	Z3023	-			
<i>espL1</i>	Z2749	+			
<i>nleH2</i>	Z6021	-			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Sistema de secreção do tipo III	CP008957.1	<i>E. coli</i> EDL933	nleA	Z6024	-
			espM1	Z2565	-
			nleG7	Z2077	-
			espR1	Z2242	+
			espK	Z1829	-
			espX7	Z1822	-
			espX2	Z1019	-
			nleH1	Z0989	-
			nleC	Z0986	-
			nleB2	Z0985	-
			espY2	Z0078	+
			espY1	Z0065	-
			espX1	Z0025	+
			yqeH	EC042_3044	+
	yqel	EC042_3045	+		
	ygeG	EC042_3049	+		
	ygeH	EC042_3050	+		
	ygeK	EC042_3053	+		
	orgB	EC042_3054	+		
	orgA	EC042_3055	+		
	eprK	EC042_3056	+		
	eprJ	EC042_3057	+		
	eprI	EC042_3058	+		
	eprH	EC042_3059	+		
	etrA	EC042_3060	+		
	epaS	EC042_3061	+		
	epaR	EC042_3062	+		
	epaQ	EC042_3063	+		
	epaP	EC042_3064	+		
	epaO	EC042_3065	+		
	eivI	EC042_3068	+		
	eivC	EC042_3069	+		
	eivA	EC042_3070	+		
eivE	EC042_3071	+			
eivG	EC042_3072	+			
eivF	EC042_3073	+			
CP009166.1	<i>E. coli</i> 1303	eivH	EC1303_c29800	+	
CCCO010000045.1	<i>E. coli</i> D6-113.11	eivJ	PGA_00447	+	
NC_002695.1	<i>E. coli</i> Sakai	espO1-1	ECs1567	-	
		espO1-2	ECs1821	-	
AY128542.1	<i>E. coli</i> C/15333	cif	-	-	
FM992854.1	<i>E. coli</i> FV11678	espT	-	-	
AP010960.1	<i>E. coli</i> 11128	efa1	ECO111_5002	-	

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071		
Sistema de secreção do tipo II	AF074613.1	<i>E. coli</i> EDL933	<i>etpC</i>	L7032	-		
			<i>etpD</i>	L7033	-		
			<i>etpE</i>	L7034	-		
			<i>etpF</i>	L7035	-		
			<i>etpG</i>	L7036	-		
			<i>etpH</i>	L7037	-		
			<i>etpI</i>	L7038	-		
			<i>etpJ</i>	L7039	-		
			<i>etpK</i>	L7040	-		
			<i>etpL</i>	L7041	-		
			<i>etpM</i>	L7042	-		
			<i>etpN</i>	L7043	-		
			<i>etpO</i>	L7044	-		
			NC_000913.3	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	<i>gspB</i>	b3322	-
					<i>gspA</i>	b3323	-
	<i>gspC</i>	b3324			-		
	<i>gspD</i>	b3325			-		
	<i>gspE</i>	b3326			-		
	<i>gspF</i>	b3327			-		
	<i>gspG</i>	b3328			-		
	<i>gspH</i>	b3329			-		
	<i>gspI</i>	b3330			-		
	<i>gspJ</i>	b3331			-		
	<i>gspK</i>	b3332			-		
	<i>gspL</i>	b3333			-		
	<i>gspM</i>	b3334			-		
	<i>gspO</i>	b3335			-		
	CP002185.1	<i>E. coli</i> W ATCC9637			<i>gspM</i>	ECW_m3226	-
			<i>gspL</i>	ECW_m3227	-		
			<i>gspK</i>	ECW_m3228	-		
			<i>gspJ</i>	ECW_m3229	-		
			<i>gspI</i>	ECW_m3230	-		
			<i>gspH</i>	ECW_m3231	-		
			<i>gspG</i>	ECW_m3232	-		
			<i>gspF</i>	ECW_m3233	-		
			<i>gspE</i>	ECW_m3234	-		
<i>gspD</i>			ECW_m3235	-			
<i>gspC</i>			ECW_m3236	-			
<i>yghG</i>			ECW_m3237	-			
<i>pppA</i>			ECW_m3238	-			
<i>yghJ</i>			ECW_m3239	-			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Adesão e Invasão	FN554767.1	<i>E. coli</i> 042 plasmídeo pAA	<i>aap</i>	EC042_pAA055	-
			<i>aatA</i>	EC042_pAA008	-
			<i>aatB</i>	EC042_pAA009	-
			<i>aatC</i>	EC042_pAA010	-
			<i>aatD</i>	EC042_pAA011	-
			<i>aatP</i>	EC042_pAA007	-
	M15677.1	<i>E. coli</i> IH11165	<i>bmaE</i>	ECOBMAE	-
	NC_002655.2	<i>E. coli</i> EDL933	<i>csgG</i>	Z_RS07750	+
			<i>csgF</i>	Z_RS07755	+
			<i>csgE</i>	Z_RS07760	+
			<i>csgD</i>	Z_RS07765	+
			<i>csgB</i>	Z_RS07775	+
			<i>csgA</i>	Z_RS07780	+
			<i>csgC</i>	Z_RS07785	+
	U07174.1	<i>E. coli</i> O9:H10:K99	<i>hra1</i>	-	-
	CP001969.1	<i>E. coli</i> IHE3034	<i>ibeB</i>	ECOK1_0581	+
			<i>ibeC</i>	ECOK1_4427	+
			<i>ibeA</i>	ECOK1_4837	-
	AE014075.1	<i>E. coli</i> CFT073	<i>iha</i>	c3610	-
			<i>tcpC</i>	-	-
CU928161.2	<i>E. coli</i> S88	<i>nlpI</i>	ECS88_3547	+	
NC_002655.2	<i>E. coli</i> EDL933	<i>ompA</i>	Z_RS05990	+	
		<i>paa</i>	Z_RS09590	-	
FN649414.1	<i>E. coli</i> H10407	<i>tia</i>	-	-	
AF074613.1	<i>E. coli</i> EDL933	<i>toxB</i>	Z_L7095	-	

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071	
Fímbria Curli	AF012835.2	<i>E. coli</i> 042	<i>aafD</i>	-	-	
	AF114828.1		<i>aafA</i>	-	-	
			<i>aafB</i>	-	-	
	FN554766.1		<i>aafC</i>	-	+	
			<i>yfcU</i>	EC042_2578	-	
			<i>yneL</i>	EC042_1639A	+	
			<i>ydeT</i>	EC042_1637	+	
			<i>ydeS</i>	EC042_1636	+	
			<i>ydeR</i>	EC042_1635	+	
	FM955458.1		<i>ydeQ</i>	EC042_1634	+	
		<i>afaA</i>	-	+		
		<i>afaB-I</i>	-	+		
		<i>afaC-I</i>	-	+		
		<i>afaD</i>	-	+		
	AF072900.3	<i>afaE-I</i>	-	+		
		<i>afaF</i>	-	-		
		<i>afaA</i>	-	-		
		<i>afaB</i>	-	-		
		<i>afaC-VIII</i>	-	-		
	AF072901.2	<i>E. coli</i> 239 KH 89	<i>afaD</i>	-	-	
			<i>afaE-VIII</i>	-	-	
			<i>afaC-VII</i>	-	-	
	<i>afaD</i>		-	-		
	<i>afaG</i>		-	-		
	<i>afaE-VII</i>		-	-		
	X85782.1		<i>E. coli</i> A22	<i>afaE-II</i>	-	-
	X76688.1		<i>E. coli</i> A30	<i>afaF</i>	-	+
				<i>afaA</i>	-	+
				<i>afaB-III</i>	-	+
		<i>afaC-III</i>		-	+	
<i>afaD</i>		-		+		
AF411067.1	<i>E. coli</i> 55989	<i>afaE-III</i>	-	-		
		<i>agg3D</i>	-	-		
		<i>agg3C</i>	-	-		
		<i>agg3B</i>	-	-		
		<i>agg3A</i>	-	-		
U12894.1	<i>E. coli</i> 17-2	<i>aggD</i>	-	-		
		<i>aggC</i>	-	-		
		<i>aggB</i>	-	-		
NC_011742.1	<i>E. coli</i> S88	<i>aggA</i>	-	-		
		<i>aufA</i>	ECS88_3825	-		
		<i>aufB</i>	ECS88_3824	-		
		<i>aufC</i>	ECS88_3823	-		
		<i>aufD</i>	ECS88_3822	-		
		<i>aufE</i>	ECS88_3821	-		
		<i>aufF</i>	ECS88_3820	-		
<i>aufG</i>	ECS88_3819	-				

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Fímbria Curli	M55661.1	<i>E. coli</i> E7473	<i>cfaA</i>	-	-
			<i>cfaB</i>	-	-
			<i>cfaC</i>	-	-
			<i>cfaE</i>	-	-
			<i>cfaD'</i>	-	-
	L48184.1	<i>E. coli</i>	<i>clpB</i>	-	-
			<i>clpC</i>	-	-
			<i>clpD</i>	-	-
			<i>clpE</i>	-	-
	L05180.1	<i>E. coli</i>	<i>clpF</i>	-	-
	M96174.1		<i>clpG</i>	-	-
	M55389.1		<i>clpH</i>	-	-
	M96152.1		<i>clpL</i>	-	-
	L05182.1		<i>cooB</i>	-	-
	AY536429.1	<i>E. coli</i>	<i>cooA</i>	-	-
			<i>cooC</i>	-	-
			<i>cooD</i>	-	-
	Z47800.1	<i>E. coli</i> C91f-6	<i>cotB</i>	-	-
			<i>cotA</i>	-	-
			<i>cotC</i>	-	-
			<i>cotD</i>	-	-
	X16944.1	<i>E. coli</i> PB176	<i>cs3-1</i>	-	-
			<i>cs3-2</i>	-	-
			<i>cs3-3</i>	-	-
	AF296132.1	<i>E. coli</i> E11881A	<i>csaA</i>	-	-
			<i>csaB</i>	-	-
			<i>csaC</i>	-	-
	AY515609.1	<i>E. coli</i> WS6788A	<i>csaE</i>	-	-
			<i>csbB</i>	-	-
			<i>csbA</i>	-	-
			<i>csbC</i>	-	-
	AY288101.1	<i>E. coli</i> WS0115A	<i>csbD</i>	-	-
<i>csdB</i>			-	-	
<i>csdA</i>			-	-	
AF145205.1	<i>E. coli</i> ARG-3	<i>csdC</i>	-	-	
		<i>csdD</i>	-	-	
		<i>cseA</i>	-	-	
		<i>cshA</i>	-	-	
X71971.1	<i>E. coli</i> PE	<i>cshB</i>	-	-	
		<i>cshC</i>	-	-	
		<i>cshD</i>	-	-	
		<i>cshE</i>	-	-	
		<i>cshF</i>	-	-	
		<i>cshG</i>	-	-	

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Fímbria Curli	AF438155.1	<i>E. coli</i> H721A	<i>csnA</i>	-	-
	AAJT02000075.1	<i>E. coli</i> B7A	<i>cssD</i>	EcB7A_2076	-
			<i>cssC</i>	EcB7A_2077	-
			<i>cssB</i>	EcB7A_2078	-
			<i>cssA</i>	EcB7A_2079	-
	AY283611.1	<i>E. coli</i> WS3294A	<i>csuB</i>	-	-
			<i>csuA1</i>	-	-
			<i>csuA2</i>	-	-
			<i>csuC</i>	-	-
			<i>csuD</i>	-	-
			<i>cswA</i>	-	-
	AY009096.1	<i>E. coli</i> 350C1	<i>cswB</i>	-	-
			<i>cswC</i>	-	-
			<i>cswD</i>	-	-
			<i>cswE</i>	-	-
			<i>cswF</i>	-	-
			<i>cswG</i>	-	-
	EU010379.1	<i>E. coli</i> C1845	<i>daaC</i>	-	+
	M98766.1		<i>daaF</i>	-	+
	M27725.1		<i>daaA</i>	-	+
	AF233530.1		<i>daaE</i>	-	-
	U95163.1		<i>daaD</i>	-	+
	AF329316.1	<i>E. coli</i> IH11128	<i>dra2E</i>	ECU95163	-
			<i>draA</i>	-	+
			<i>draB</i>	-	+
			<i>draC</i>	-	+
			<i>draD</i>	-	+
			<i>draP</i>	-	+
			<i>draE</i>	-	-
			<i>eafA</i>	ECW_m3364	+
			<i>eafB</i>	ECW_m3363	+
			<i>eafC</i>	ECW_m3362	+
			<i>eafD</i>	ECW_m3361	-
			<i>lpfA</i>	ECW_m4031	+
			<i>lpfB</i>	ECW_m4030	+
			<i>lpfC</i>	ECW_m4029	+
	<i>lpfD</i>	ECW_m4028	+		
	CP002185.1	<i>E. coli</i> W ATCC9637	<i>lpfA1</i>	ECW_m3818	-
			<i>lpfB1</i>	ECW_m3817	-
			<i>lpfC1</i>	ECW_m3816	-
<i>lpfD1</i>			ECW_m3815	-	
<i>lpfE1</i>			ECW_m3814	-	
<i>f17d-A</i>			-	-	
<i>f17d-D</i>			-	-	
<i>f17d-C</i>			-	-	
<i>f17d-G</i>			-	-	
<i>hdaD</i>			-	-	
EU637023.1	<i>E. coli</i> C1010-00	<i>hdaC</i>	-	-	
		<i>hdaB</i>	-	-	
		<i>hdaA</i>	-	-	

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Fímbria Curli	NC_002655.2	<i>E. coli</i> EDL933	<i>ecpE</i>	Z0356	+
			<i>ecpD</i>	Z0357	+
			<i>ecpC</i>	Z0358	+
			<i>ecpB</i>	Z0359	+
			<i>ecpA</i>	Z0360	+
			<i>ecpR</i>	Z0361	+
			<i>ycbQ</i>	Z1286	+
			<i>ycbR</i>	Z1287	+
			<i>ycbS</i>	Z1288m	+
			<i>ycbT</i>	Z1290	+
			<i>ycbU</i>	Z1291	+
			<i>ycbV</i>	Z1292	+
			<i>ycbF</i>	Z1293m	+
			AP009243.1	<i>E. coli</i> SE11	<i>faeD</i>
	<i>faeE</i>	ECSE_P3-0032			-
	<i>faeF</i>	ECSE_P3-0033			-
	<i>faeG</i>	ECSE_P3-0034			-
	<i>faeH</i>	ECSE_P3-0035			-
	<i>faeI</i>	ECSE_P3-0036			-
	NC_011416.1	<i>E. coli</i>	<i>faeJ</i>	ECSE_P3-0037	-
			<i>faeC</i>	-	-
	CP000970.1	<i>E. coli</i> SMS-3-5	<i>fanH</i>	EcSMS35_3922	-
			<i>fanG</i>	EcSMS35_3923	-
			<i>fanF</i>	EcSMS35_3924	-
			<i>fanE</i>	EcSMS35_3925	-
			<i>fanD</i>	EcSMS35_3926	-
			<i>fanC</i>	EcSMS35_3927	-
	NC_007946.1	<i>E. coli</i> UTI89	<i>fimB</i>	UTI89_C5009	+
			<i>fimE</i>	UTI89_C5010	+
			<i>fimA</i>	UTI89_C5011	+
			<i>fimI</i>	UTI89_C5012	+
			<i>fimC</i>	UTI89_C5013	+
			<i>fimD</i>	UTI89_C5014	+
			<i>fimF</i>	UTI89_C5015	+
<i>fimG</i>			UTI89_C5016	+	
<i>fimH</i>			UTI89_C5017	+	
X61239.1 X61238.1 M20181.1			<i>E. coli</i> J96	<i>papGI</i>	-
	<i>papGIII</i>	-		-	
	<i>papGII</i>	ECOPAPK		-	
AJ307043.1	<i>E. coli</i> X2194	<i>pixB</i>	-	-	
		<i>pixA</i>	-	-	
		<i>pixH</i>	-	-	
		<i>pixC</i>	-	-	
		<i>pixD</i>	-	-	
		<i>pixJ</i>	-	-	
		<i>pixF</i>	-	-	
		<i>pixG</i>	-	-	

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Fímbria Curli	NC_009602.1	<i>E. coli</i> 3072/96	<i>sfpA</i>	SF0157_p06	-
			<i>sfpH</i>	SF0157_p07	-
			<i>sfpC</i>	SF0157_p08	-
			<i>sfpD</i>	SF0157_p09	-
			<i>sfpJ</i>	SF0157_p10	-
	AH004279.2	<i>E. coli</i> O83:K1:H4 827	<i>nfaA</i>	-	-
			<i>nfaE</i>	-	+
			<i>ldaA</i>	-	-
			<i>ldaC</i>	-	-
			<i>ldaD</i>	-	-
	AY858803.1	<i>E. coli</i>	<i>ldaE</i>	-	-
			<i>ldaF</i>	-	-
			<i>ldaG</i>	-	-
			<i>ldaH</i>	-	-
			<i>ldal</i>	-	-
			<i>ldaB</i>	-	-
			<i>fotS</i>	-	-
			<i>fotT</i>	-	-
	AF335469.1	<i>E. coli</i> ARG-2	<i>fotA</i>	-	-
			<i>fotB</i>	-	-
			<i>fotC</i>	-	-
			<i>fotD</i>	-	-
			<i>fotE</i>	-	-
			<i>fotF</i>	-	-
			<i>fotG</i>	-	-
	AE014075.1	<i>E. coli</i> CFT073	<i>focI-2</i>	c1237	+
			<i>focB</i>	c1238	+
			<i>focA</i>	c1239	-
			<i>focI</i>	c1240	-
			<i>focC</i>	c1241	-
			<i>focD</i>	c1242	-
			<i>focF</i>	c1243	-
			<i>focG</i>	c1244	-
			<i>focH</i>	c1245	-
			<i>focY</i>	c1246	-
			<i>focX</i>	c1247	+
<i>yqiL</i>			c3791	-	
<i>yqiG</i>			c3792	-	
AY858803.1	<i>E. coli</i>	<i>yqiH</i>	c3793	-	
		<i>yqil</i>	c3794	-	
		<i>ldaA</i>	-	-	
		<i>ldaC</i>	-	-	
		<i>ldaD</i>	-	-	
		<i>ldaE</i>	-	-	
		<i>ldaF</i>	-	-	
		<i>ldaG</i>	-	-	
<i>ldaH</i>	-	-			
<i>ldal</i>	-	-			
<i>ldaB</i>	-	-			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Fímbria Curli	NC_000913.3	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	<i>gltF</i>	b3214	-
			<i>yhcA</i>	b3215	-
			<i>yhcD</i>	b3216	-
			<i>yhcE</i>	b4569	-
			<i>yhcF</i>	b3219	-
			<i>sfmA</i>	b0530	+
			<i>sfmC</i>	b0531	+
			<i>sfmD</i>	b0532	+
			<i>sfmH</i>	b0533	+
			<i>sfmF</i>	b0534	+
			<i>sfmZ</i>	b0535	+
			<i>yadN</i>	b0141	+
			<i>yadV</i>	b0140	+
			<i>htrE</i>	b0139	+
			<i>yadM</i>	b0138	-
			<i>yadL</i>	b0137	-
			<i>yadK</i>	b0136	-
			<i>yadC</i>	b0135	-
			<i>ybgD</i>	b0719	-
			<i>ybgQ</i>	b0718	-
			<i>ybgP</i>	b0717	-
			<i>ybgO</i>	b0716	-
			<i>yehD</i>	b2111	+
			<i>yehC</i>	b2110	+
			<i>yehB</i>	b2109	+
			<i>yehA</i>	b2108	+
			<i>yfcV</i>	b2339	-
			<i>yfcS</i>	b2336	-
			<i>yfcR</i>	b2335	-
			<i>yfcQ</i>	b2334	-
			<i>yfcP</i>	b2333	-
			<i>yfcO</i>	b2332	-
			<i>yraH</i>	b3142	-
<i>yraI</i>	b3143	-			
<i>yraJ</i>	b3144	-			
<i>yraK</i>	b3145	-			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Fímbria Curli	NC_007946.1	<i>E. coli</i> UT189	<i>papX</i>	UT189_RS23655	+
			<i>papG</i>	UT189_RS23660	-
			<i>papF</i>	UT189_RS23665	+
			<i>papE</i>	UT189_RS23670	+
			<i>papK</i>	UT189_RS23675	+
			<i>papJ</i>	UT189_RS23680	+
			<i>papD</i>	UT189_RS23685	+
			<i>papC</i>	UT189_RS23690	+
			<i>papH</i>	UT189_RS23695	+
			<i>papA</i>	UT189_RS23700	+
			<i>papB</i>	UT189_RS23705	+
			<i>papI</i>	UT189_RS23715	+
			<i>sfaC</i>	UT189_RS05340	+
			<i>sfaB</i>	UT189_RS05345	+
			<i>sfaA</i>	UT189_RS05350	-
			<i>sfaD</i>	UT189_RS05355	-
			<i>sfaE</i>	UT189_RS05360	-
			<i>sfaF</i>	UT189_RS05365	-
			<i>sfaG</i>	UT189_RS5370	-
			<i>sfaS</i>	UT189_RS05375	-
<i>sfaH</i>	UT189_RS05380	-			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Flagelo	CP008957.1	<i>E. coli</i> EDL933	<i>flgN</i>	EDL933_1646	+
			<i>flgA</i>	EDL933_1648	+
			<i>flgB</i>	EDL933_1650	+
			<i>flgC</i>	EDL933_1651	+
			<i>flgD</i>	EDL933_1652	+
			<i>flgE</i>	EDL933_1653	+
			<i>flgF</i>	EDL933_1654	+
			<i>flgG</i>	EDL933_1655	+
			<i>flgH</i>	EDL933_1656	+
			<i>flgI</i>	EDL933_1657	+
			<i>flgJ</i>	EDL933_1658	+
			<i>flgK</i>	EDL933_1659	+
			<i>flgL</i>	EDL933_1660	+
			<i>flhE</i>	EDL933_2852	+
			<i>flhA</i>	EDL933_2853	+
			<i>flhB</i>	EDL933_2854	+
			<i>cheZ</i>	EDL933_2856	+
			<i>cheY</i>	EDL933_2857	+
			<i>cheB</i>	EDL933_2858	+
			<i>cheR</i>	EDL933_2859	+
			<i>cheM</i>	EDL933_2861	+
			<i>cheW</i>	EDL933_2862	+
			<i>cheA</i>	EDL933_2863	+
			<i>motB</i>	EDL933_2864	+
			<i>motA</i>	EDL933_2865	+
			<i>flhC</i>	EDL933_2866	+
			<i>flhD</i>	EDL933_2867	+
			<i>fliY</i>	EDL933_2927	+
			<i>fliZ</i>	EDL933_2928	+
			<i>fliA</i>	EDL933_2929	+
			<i>fliC</i>	EDL933_2931	+
			<i>fliD</i>	EDL933_2932	+
<i>fliS</i>	EDL933_2933	+			
<i>fliT</i>	EDL933_2933	+			
<i>fliE</i>	EDL933_2944	+			
<i>fliF</i>	EDL933_2946	+			
<i>fliG</i>	EDL933_2947	+			
<i>fliJ</i>	EDL933_2950	+			
<i>fliK</i>	EDL933_2951	+			
<i>fliL</i>	EDL933_2952	+			
<i>fliM</i>	EDL933_2953	+			
<i>fliN</i>	EDL933_2954	+			
<i>fliP</i>	EDL933_2956	+			
<i>fliQ</i>	EDL933_2957	+			

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071	
Flagelo	CP008957.1	<i>E. coli</i> EDL933	<i>fliR</i>	EDL933_2958	+	
			<i>flk</i>	EDL933_3488	+	
			<i>fliH</i>	Z3030	+	
			AE005174.2	<i>fliI</i>	Z3031	+
				<i>fliO</i>	Z3037	+
	CP010344.1	<i>E. coli</i> ECC-1470	<i>flkA</i>	E1470_c3260 0	-	
			<i>flkB</i>	E1470_c3259 0	-	
	FN554766.1	<i>E. coli</i> 042	<i>lfhA</i>	EC042_0245	+	
			<i>lfhB</i>	EC042_0246	+	
			<i>lfiR</i>	EC042_0247	+	
			<i>lfiQ</i>	EC042_0248	+	
			<i>lfiP</i>	EC042_0249	+	
			<i>lfiN</i>	EC042_0250	+	
			<i>lfiM</i>	EC042_0251	+	
			<i>lafK</i>	EC042_0252	+	
			<i>lfiE</i>	EC042_0253	+	
			<i>lfiF</i>	EC042_0254	+	
			<i>lfiG</i>	EC042_0255	+	
			<i>lfiH</i>	EC042_0256	+	
			<i>lfiI</i>	EC042_0257	+	
			<i>lfiJ</i>	EC042_0258	+	
			<i>lafV</i>	EC042_0261	+	
			<i>lfgN</i>	EC042_0262	+	
			<i>lfgM</i>	EC042_0263	+	
			<i>lfgA</i>	EC042_0264	+	
			<i>lfgB</i>	EC042_0265	+	
			<i>lfgD</i>	EC042_0267	+	
			<i>lfgE</i>	EC042_0268	+	
			<i>lfgF</i>	EC042_0269	+	
			<i>lfgG</i>	EC042_0270	+	
			<i>lfgH</i>	EC042_0271	+	
			<i>lfgI</i>	EC042_0272	+	
<i>lfgJ</i>	EC042_0273	+				
<i>lfgK</i>	EC042_0274	+				
<i>lfgL</i>	EC042_0275	+				
<i>lafW</i>	EC042_0276	+				
<i>lafZ</i>	EC042_0279	+				
<i>lafA</i>	EC042_0280	+				
<i>lafB</i>	EC042_0281	+				
<i>lafC</i>	EC042_0282	+				
<i>lafD</i>	EC042_0283	+				
<i>lafE</i>	EC042_0284	+				
<i>lafF</i>	EC042_0285	+				
<i>lafS</i>	EC042_0286	+				

Anexo C

Pesquisa de fatores de virulência no ecoli VF collection.

Fatores de Virulência	Sequência de Referência	Cepa de Referência	Gene	locus tag	EC071
Flagelo	FN554766.1	<i>E. coli</i> 042	<i>lafT</i>	EC042_0287	+
			<i>lafU</i>	EC042_0288	+
	CP009166.1	<i>E. coli</i> 1303	<i>lfgC</i>	EC1303_c02530	+
Outros	DQ381420.1	<i>E. coli</i> APEC O1 plasmídeo pAPEC-O1-	<i>etsA</i>	APECO1_O1CoBM197	-
	DQ381420.1		<i>etsB</i>	APECO1_O1CoBM198	-
	DQ381420.1	ColBM	<i>etsC</i>	APECO1_O1CoBM199	-

Anexo D

Análises de bioinformática realizadas no genoma da cepa EC071: verificação da presença de sequências de inserção nas regiões flanqueadoras de *sat*.

04/02/2021	NCBI Blast:NODE_75_length_13824_cov_39.5135
BLAST ® >> blastn suite >> results for RID-1SJ6552Z016	
Your search is limited to records that include: insertion sequences (taxid:2673)	
Job Title	NODE_75_length_13824_cov_39.5135...
RID	1SJ6552Z016 Search expires on 02-06 02:19 am
Program	nt
Database	lcl Query_54223
Query ID	NODE_75_length_13824_cov_39.5135...
Description	NODE_75_length_13824_cov_39.5135...
Molecule type	dna
Query Length	13824
No significant similarity found. For reasons why, click here	

Anexo D

Análises de bioinformática realizadas no genoma da cepa EC071: verificação da presença das ilhas de patogenicidade PAI I e PAII da cepa UPEC CFT073.

04/02/2021 NCBI Blast:PAI I CFT073 x Node 75 EC071

BLAST® » [blastn suite-2sequences](#) » results for RID-1SGZT0NS114

Job Title [PAI I CFT073 x Node 75 EC071...](#)
 RID [1SGZT0NS114](#) Search expires on 02-06 01:59 am
 Program Blast 2 sequences
 Query ID [NC_004431.1](#) (dna)
 Query Descr [None...](#)
 Query Length 44642
 Subject ID [Ic|Query_16253](#) (dna)
 Subject Descr [NODE_75_length_13824_cov_39.5135...](#)
 Subject Length 13824

Descriptions

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
NODE_75_length_13824_cov_39.5135		2663	3382	4%	0.0	98.60%	13824	Query_16253

Graphic Summary

Distribution of the top 4 Blast Hits on 1 subject sequences

3406225 3414724 3423224 3431724 3440224 3448724

04/02/2021 NCBI Blast:PAI II CFT073 x Node 75 EC071

BLAST® » [blastn suite-2sequences](#) » results for RID-1SGRGA8F11N

Job Title [PAI II CFT073 x Node 75 EC071...](#)
 RID [1SGRGA8F11N](#) Search expires on 02-06 01:54 am
 Program Blast 2 sequences
 Query ID [NC_004431.1](#) (dna)
 Query Descr [None...](#)
 Query Length 58294
 Subject ID [Ic|Query_281401](#) (dna)
 Subject Descr [NODE_75_length_13824_cov_39.5135...](#)
 Subject Length 13824

Descriptions

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
NODE_75_length_13824_cov_39.5135		327	327	0%	1e-90	100.00%	13824	Query_281401

Graphic Summary

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences

4913367 4923366 4933366 4943366 4953366 4963366

Anexo E

Confirmação da identidade de Sat purificada por espectrometria de massas.

Protein List									
Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
1	195	Q8FDW4 SAT_ECOL6	202.60	42	52	51	Y	140042	Serine protease sat autotransporter OS=Escherichia coli O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC) OX=199310 GN=sat PE=1 SV=2
3	378	A7FCR5 LIGR_YFRP3	27.63	1	1	1	N	63624	DNA ligase B OS=Yersinia pseudotuberculosis serotype O:1b (strain IP 31758) OX=349747 GN=ligB PE=3 SV=1
4	463	Q76N89 HECW1_HUMAN	26.79	0	1	1	Y	179553	E3 ubiquitin-protein ligase HECW1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HECW1 PE=1 SV=3
2	373	B5Z6D1 CH60_HELPG	23.45	1	1	1	Y	58228	60 kDa chaperonin OS=Helicobacter pylori (strain G27) OX=563041 GN=groL PE=3 SV=1
2	374	B6JPA7 CH60_HELP2	23.45	1	1	1	Y	58300	60 kDa chaperonin OS=Helicobacter pylori (strain P12) OX=570508 GN=groL PE=3 SV=1
2	372	Q7U317 CH60_HELPH	23.45	1	1	1	Y	57651	60 kDa chaperonin OS=Helicobacter hepaticus (strain ATCC 51449 / 3B1) OX=235279 GN=groL PE=3 SV=1
6	207	Q82WTS CYSA_NITEU	21.49	2	1	1	N	40893	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein CysA OS=Nitrosomonas europaea (strain ATCC 19718 / CIP 103999 / KCTC 2705 / NBRC 14298) OX=228410 GN=cysA PE=3 SV=1
total 7 proteins									
Q8FDW4 SAT_ECOL6									back to list
Protein Coverage Supporting Peptides									

file:///C:/Users/claudia.freire/Desktop/33/33/protein.html

2/6

Anexo FConfirmação da inserção da construção pCF2 no gene *sat* da cepa EC071.

13/03/2020 NCBI Blast:TR2 M13 R

BLAST® » [blastn suite-2sequences](#) » results for RID-6RNE1VYW114

Job Title [TR2.M13.R...](#)
 RID [6RNE1VYW114](#) Search expires on 03-15 02:49 am
 Program Blast 2 sequences
 Query ID lc|Query_26796 (dna)
 Query Descr [None ...](#)
 Query Length 1057
 Subject ID lc|Query_26798 and 1 more subject(s) (dna)
 Subject Descr* [See details](#)
 Subject Length 7014

Descriptions

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Ec-071	1022	1022	60%	0.0	94.70%	Query_26798
pJP5603	80.5	80.5	4%	4e-18	94.23%	Query_26799

Graphic Summary

Distribution of the top 2 Blast Hits on 2 subject sequences

1 200 400 600 800 1000

Anexo FConfirmação da inserção da construção pCF2 no gene *sat* da cepa EC071.

Ec-071
Sequence ID: Query_26798 Length: 3888 Number of Matches: 1
Range 1: 1526 to 2163

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1022 bits(553)	0.0()	607/641(95%)	6/641(0%)	Plus/Minus	
Query 56	TTCAGAAGCTCASCGAATCATTGCTCCCTGGTATTTCTTTGTGGAACGGACTGGGTACCC	115			
Sbjct 2163	TTCAGAAGCACAGCGAATCATTGCTCCCTGGTATTTCTTTGTGGAACGGACTGGGTACCC	2104			
Query 116	GTTTTGAAAGAAACAGAGAGTTTCATATAATAAAAAGTTCAATTCTGATCACAAAAGTAAT	175			
Sbjct 2103	GTTTTGAAAGAAACAGAGAGTTTCATATAATAAAAAGTTCAATTCTGATCACAAAAGTAAT	2044			
Query 176	AATCAGCAGACCTCATTGATCAGCCAGACTGGAAAACCGGGGTGTTTAAATTTGATACA	235			
Sbjct 2043	AATCAGCAGACCTCATTGATCAGCCAGACTGGAAAACCGGGGTGTTTAAATTTGATACA	1984			
Query 236	TTACACCTGAACAATGCTGACTTTTCAATATCACGCAATGCCAATGTTGAAGGAAATATA	295			
Sbjct 1983	TTACACCTGAACAATGCTGACTTTTCAATATCACGCAATGCCAATGTTGAAGGAAATATA	1924			
Query 296	TCAGCAAATAAATCAGCTATCACAAATCGGCGATAAAAAATGCTTACATTGATAATCTTGCA	355			
Sbjct 1923	TCAGCAAATAAATCAGCTATCACAAATCGGCGATAAAAAATGCTTACATTGATAATCTTGCA	1864			
Query 356	GGGAAAAATATTACTAATAATGGTTTTGACTTCAAACAAACTATCAGTACTAATCTATCC	415			
Sbjct 1863	GGGAAAAATATTACTAATAATGGTTTTGACTTCAAACAAACTATCAGTACTAATCTATCC	1804			
Query 416	ATAGGAGAAACTWWATTTTTTCWKTTTGGCATCACTGCACATAACAGCCAAATAGYCRTAG	475			
Sbjct 1803	ATAGGAGAAACTAAAATTA-CAGG-TGGCATCACTGCACATAACAGCCAAATAGCCATAG	1746			
Query 476	GTGATCAAGCTGTAGTTACTTAAATGGTGCAACCTTTCTGAATAAATACTCCTATAAGTA	535			
Sbjct 1745	GTGATCAAGCTGTAGTTACTTAAATGGTGCAACCTTTCTGAATAAATACTCCTATAAGTA	1686			
Query 536	TAGATAAAGGAGCAAAGTTATAGCACAAAATTCWTGTTTCRAACAAAAGGWATTGATA	595			

13/03/2020

NCBI Blast:TR2 M13 R

Sbjct 1685	TAGATAAAGGAGCAAAGTTATAGCACAAAATTCATGTTTCAACAACAAAAGGTATTGATA	1626			
Query 596	TCTCCTGTGAACTGACTATGATGGGAGTCCCTGCRCAGAATRG-AMAACTG-ARCGCGGG	653			
Sbjct 1625	TCTCCGGTGAAGTACTGACTATGATGGGAATCCCTGAACAGAATAGTAAAAGTAAACGCCGG	1566			
Query 654	GSCGGCWCTACGCTGCTGATGGAWTG-GGCTGAGGTGGKGG	693			
Sbjct 1565	GTCTCCACTACGCTGCTGATGGATTGAGGCTGAG-TGGTGG	1526			

pJP5603

Sequence ID: Query_26799 Length: 3126 Number of Matches: 1

Range 1: 1405 to 1456

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
80.5 bits(43)	4e-18()	49/52(94%)	2/52(3%)	Plus/Plus	
Query 3	TGMATG-CTGCA-GTCGACTTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC	52			
Sbjct 1405	TGCATGCCTGCAGGTGCTGACTTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC	1456			