

CLAUDIA ANDRADE FREIRE

**Papel da serinoprotease Sat na patogênese da
sepsis 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

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 à 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.

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).

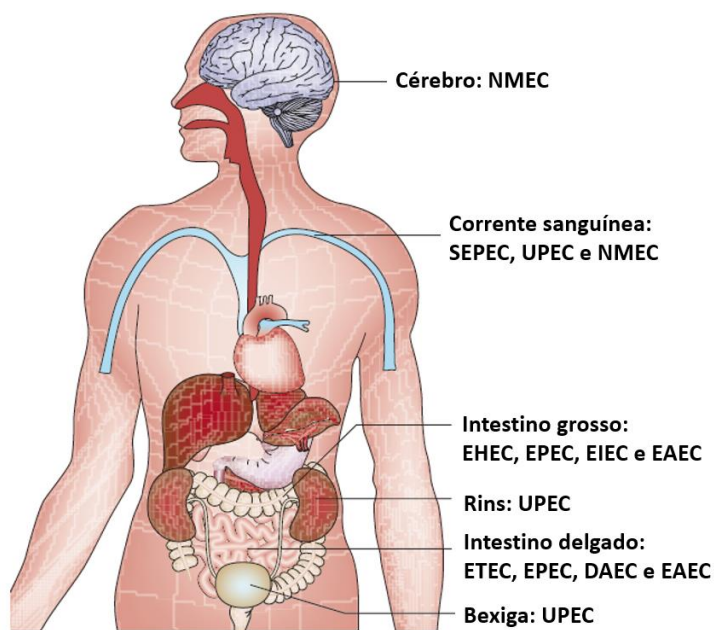
A estrutura genômica de *E. coli* é dividida em duas grandes partes. A primeira representa uma parte comum a todas as cepas, denominada *core genome*, e contém genes conservados necessários para as funções celulares, também chamados de *housekeeping genes* (DOBRINDT, 2005; PITOUT, 2012). A análise de 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).

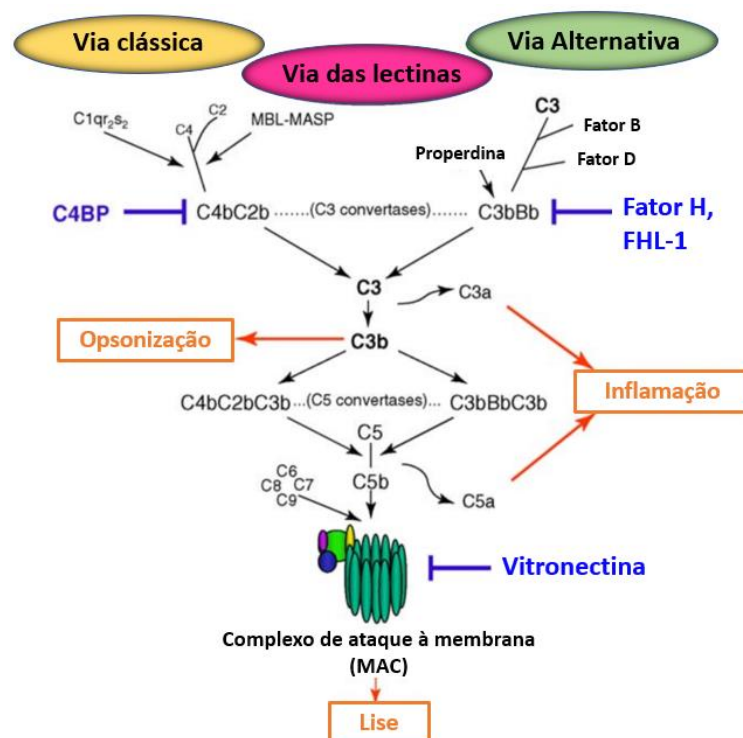
1.4.1 Sistema complemento

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 pentaxinas. 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

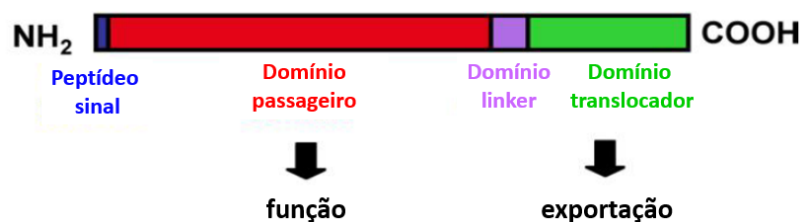
1.6 Serinoproteases autotransportadoras da família Enterobacteriaceae

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).

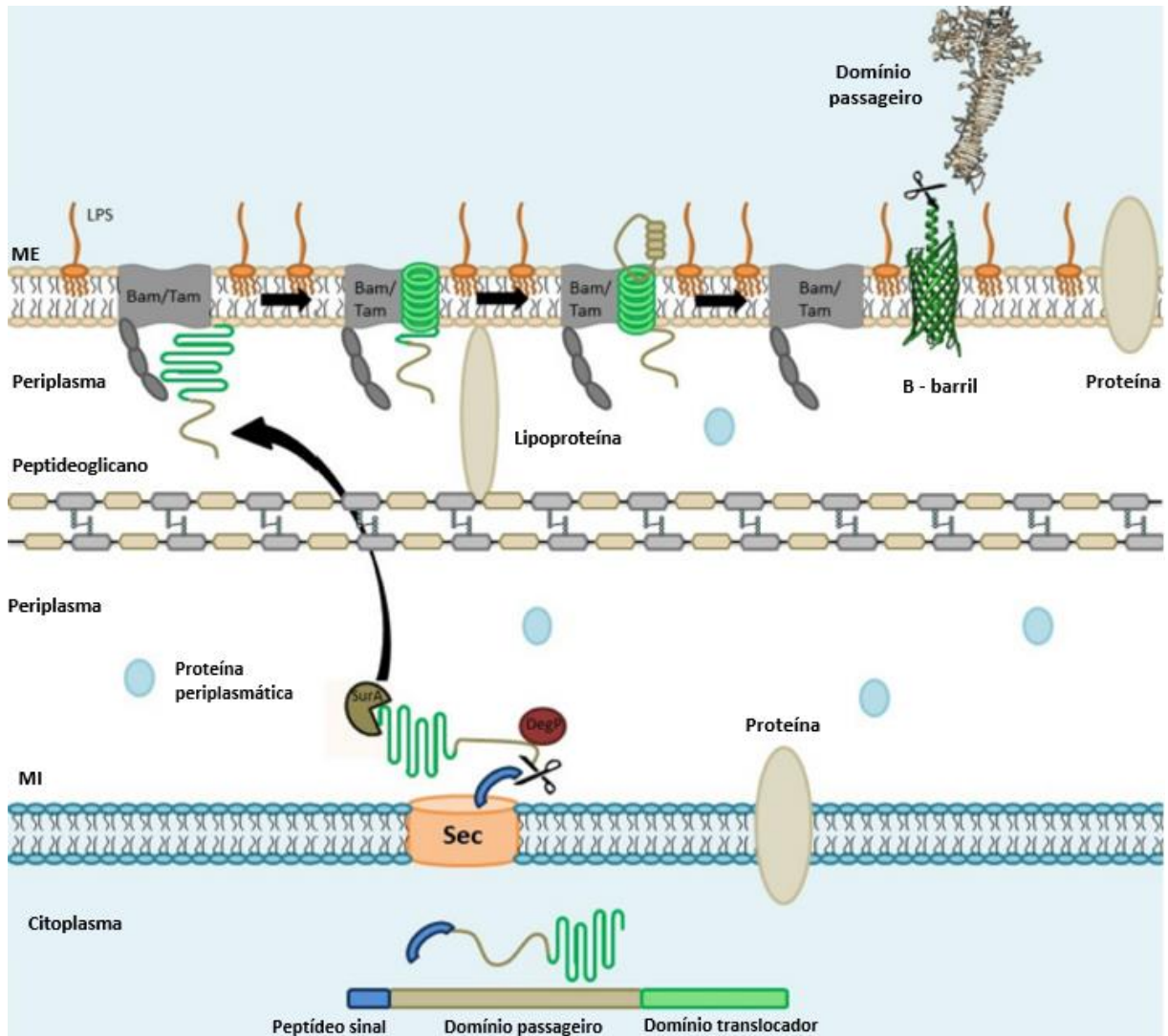
O sistema de secreção do tipo V (SST5) é exclusivo das bactérias Gram negativas, uma vez que se insere apenas na membrana externa. Em comparação com os outros sistemas de secreção, sua estrutura é muito mais simples e sua fonte de

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).

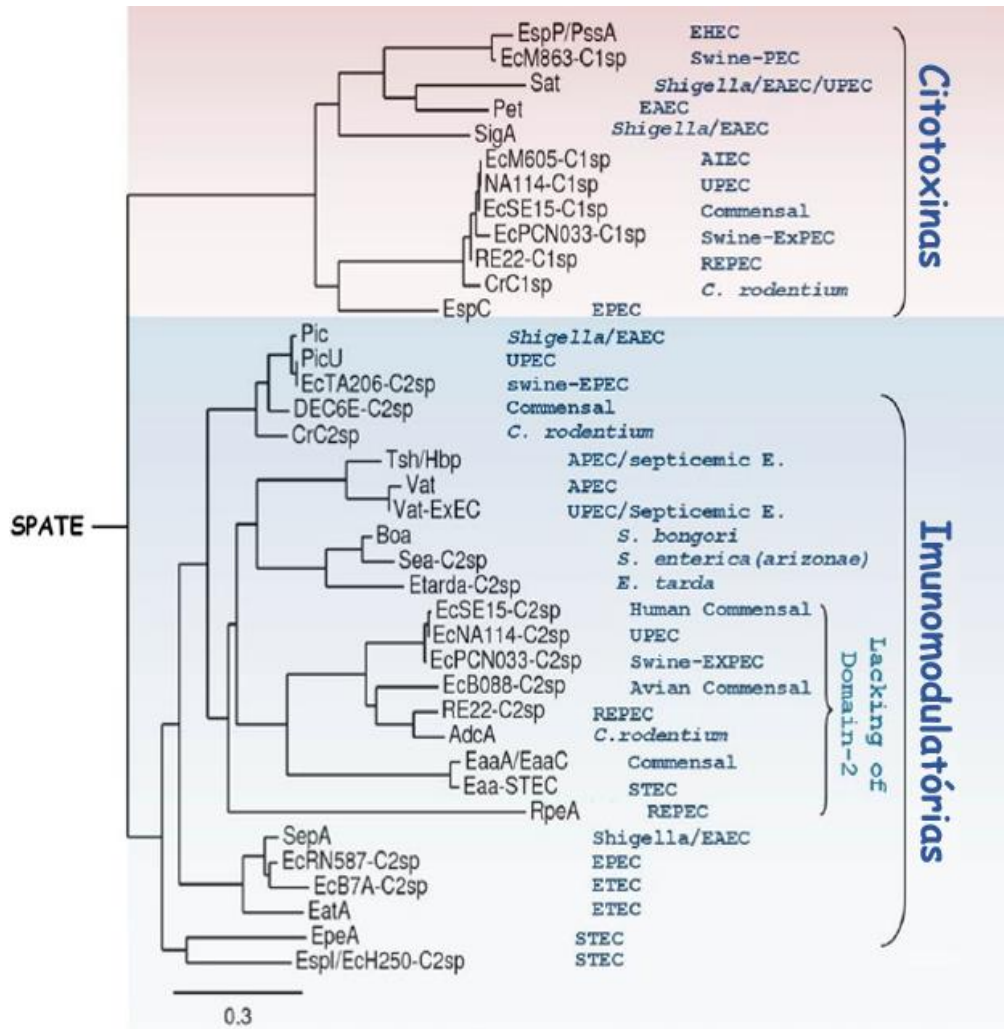
LPS: Lipopolissacarídeos; ME: membrana externa; MI: membrana interna.

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

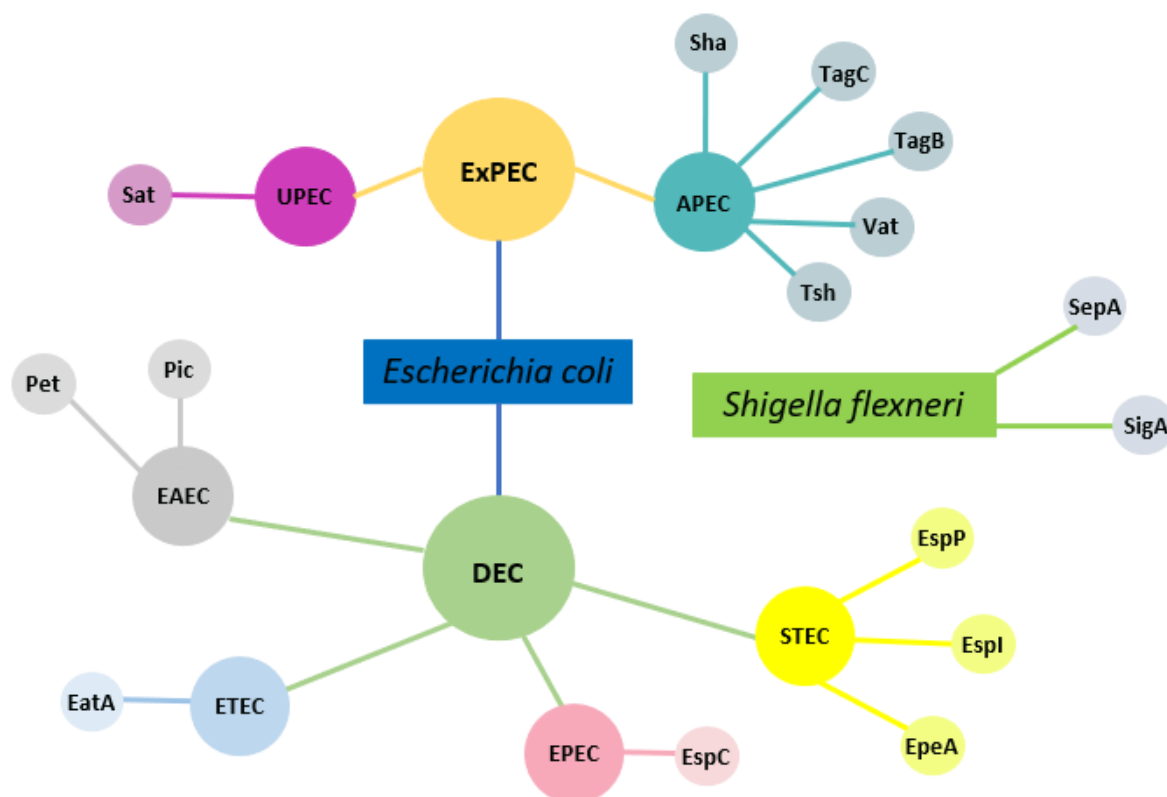
al., 2002; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Os membros já caracterizados dessa classe são Pic (HENDERSON et al., 1999), Tsh (PROVENCE; CURTISS, 1994), Vat (PARREIRA; GYLES, 2003), SepA (BENJELLOUN-TOUIMI; SANSONETTI; PARSOT, 1995), EatA (PATEL et al., 2004), EpeA (LEYTON et al., 2003) e EspI (SCHMIDT et al., 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.

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* NalP 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. Diarrheagenic *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 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. **Infect. 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*. **Infect. 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. **Infect. 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*. **Infec. 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.

SPANIO, 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.